



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού
Περιβάλλοντος.**

ΤΙΤΛΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

**“Επίδραση των διαφορετικών φυτορρυθμιστικών
ουσιών στην αναγέννηση βλαστικών εκφύτων
τριανταφυλλιάς.”**



Φοιτήτρια: Παπαμιχαήλ Μυρσίνη

Επιβλέπων καθηγητής: Λύκας Χρήστος

ΒΟΛΟΣ, 2017

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η προκειμένη πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ανθοκομίας, στο τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος στο Βόλο. Διήρκεσε περίπου δύο έτη, συγκεκριμένα από τον Φεβρουάριο του 2016 έως τον Οκτώβριο του 2017.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Λύκα Χρήστο για την ανάθεση της παρούσας μελέτης, καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου προσέφερε καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος και μέχρι την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας.

Τέλος, οι σημαντικότερες ευχαριστίες ανήκουν στην οικογένεια και στις φίλες μου για την ψυχολογική και ηθική υποστήριξη που μου παρείχαν, όπως επίσης και για την εποικοδομητική τους βοήθεια στην ολοκλήρωση της διατριβής μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εργασία αυτή εξετάζεται η επίδραση που ασκούν οι διαφορετικές φυτορρυθμιστικές ουσίες, και συγκεκριμένα οι αυξίνες και οι κυτοκινίνες, στην αναγέννηση βλαστικών εκφύτων τριανταφυλλιάς. Η επιλογή του συγκεκριμένου φυτού έγινε εξαιτίας της μεγάλης οικονομικής σημασίας που κατέχει σε παγκόσμιο επίπεδο και κατ' επέκταση της επιτακτικής ανάγκης που υπάρχει για την εύρεση ταχύτερων και ακριβέστερων τρόπων πολλαπλασιασμού του.

Με λίγα λόγια, μελετήθηκαν τα αποτελέσματα που μπορούν να δώσουν οι διάφοροι συνδυασμοί των φυτορρυθμιστικών ουσιών ως προς την βλαστική αναγέννηση καλικών κυττάρων κάτω από εργαστηριακές και ασηπτικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να αποτελέσουν βάση για μία μελλοντική μελέτη πάνω στην εξέλιξη της μεθόδου του εμβολιασμού. Συνδυασμοί με αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα στο εργαστήριο, πιθανόν να έδιναν έναν επιτυχή εμβολιασμό με καλικά κύτταρα σε φυτό στο εξωτερικό περιβάλλον.

Για το λόγο αυτό, έγινε μελέτη για τον προσδιορισμό των παραγόντων που μπορούν να παρεμποδίσουν τη γρήγορη επούλωση τομών εμβολιασμού στις οποίες μπορούν να εμφυτευτούν καλικά κύτταρα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
Α.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.Τριανταφυλλιά.....	6
1.1.Γενικά στοιχεία.....	6
1.2.Πολλαπλασιασμός.....	7
2.Ιστοκαλλιέργεια.....	10
2.1.Ορισμός-Γενικά στοιχεία.....	10
2.2.Εφαρμογές της ιστοκαλλιέργειας και παράγοντες που την επηρεάζουν.....	11
2.3.Προβλήματα της ιστοκαλλιέργειας.....	12
3.Διαφοροποίηση-Σωματική εμβρυογένεση-Οργανογένεση.....	14
3.1.Ορισμοί.....	14
3.2.Διεργασίες που οδηγούν στην διαφοροποίηση.....	15
3.2.1. Υποδοχή και μεταφορά σήματος.....	15
3.2.2.Αύξηση.....	16
3.2.3.Κυτταρική Διαίρεση.....	17
3.2.4.Ανάπτυξη.....	18
3.3.Ιστοκαλλιέργεια και οργανογένεση στην τριανταφυλλιά.....	19
4.Φυτορρυθμιστικές ουσίες.....	20
4.1.Γενικά στοιχεία.....	20
4.2.Αυξίνες.....	22
4.2.1.Ιστορικά-Γενικά στοιχεία.....	22
4.2.2.Βιοσύνθεση των αυξινών.....	23
4.2.3.Μεταφορά μέσα στο φυτό.....	24
4.2.4.Είσοδος της αυξίνης στο κύτταρο.....	24
4.2.5.Δράσεις αυξινών.....	25
4.3.Κυτοκινίνες.....	27
4.3.1.Ιστορικά-Γενικά στοιχεία.....	27
4.3.2.Βιοσύνθεση των κυτοκινινών.....	27
4.3.3.Μεταφορά κυτοκινινών μέσα στο φυτό.....	28

4.3.4.Δράσεις κυτοκινινών.....	28
4.4.Οι αυξίνες και οι κυτοκινίνες στην ιστοκαλλιέργεια.....	31
5.Σκοπός εργασίας.....	34
Β.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
1. Αρχικό υλικό- Κάλος.....	35
2. Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος.....	35
3. Προσθήκη μυκητοκτόνου.....	37
4. Τοποθέτηση κάλου στα υποστρώματα.....	37
5. Τομές σε φυτό στο περιβάλλον.....	39
Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	40
1.Δοκιμές στο εργαστήριο.....	40
2.Δοκιμές στο εξωτερικό περιβάλλον.....	44
Δ.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	46
Ε.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	51
ΣΤ.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	52

A.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.Τριανταφυλλιά.

1.1.Γενικά στοιχεία.

Η τριανταφυλλιά (*Rosa hybrida*) είναι ανθοκομικό, καλλωπιστικό φυτό που ανήκει στην οικογένεια των Ροδοειδών (*Rosaceae*). Οι σημερινές ποικιλίες τριανταφυλλιάς προέρχονται όλες από υβρίδια τσαγιού *Rosa gallica* και *Rosa chinensis* που δημιουργήθηκαν στην Κίνα και λέγεται ότι πλέον υπάρχουν πάνω από 30.000 ποικιλίες τριανταφυλλιάς που καλλιεργούνται ευρέως (Kim *et al.*, 2003). Παγκοσμίως, είναι από άποψη οικονομίας ένα από τα πιο σημαντικά ανθοκομικά φυτά, με εκτεταμένη εμπορική αξία και για το σκοπό αυτό πολλές έρευνες διεξάγονται για την βελτίωση και τον πολλαπλασιασμό του. Στην Ελλάδα η ανθοκομία καλύπτει έκταση 13.000 στρεμμάτων, από τα οποία 5.550 στρέμματα καλλιεργούνται με δρεπτά άνθη. Τα τελευταία χρόνια, οι ανθοκαλλιέργειες της υπαίθρου έχουν υποστεί βαθμιαία μείωση μεγέθους 18%, σε αντίθεση με τις θερμοκηπιακές καλλιέργειες που έχουν αυξηθεί σημαντικά. Το τριαντάφυλλο κατέχει την δεύτερη θέση στην κατηγορία των δρεπτών ανθέων, με 950 στρέμματα, κυρίως σε θερμοκήπια, με το γαρύφαλλο να βρίσκεται στην κορυφή της κατηγορίας με 1400 στρέμματα. Ο ετήσιος τζίρος από την εμπορία των ανθοκομικών προϊόντων στην Ελλάδα ξεπερνά τα 300 εκατομμύρια ευρώ, από τα οποία το 70 % προέρχεται από την ελληνική παραγωγή και το υπόλοιπο 30% από τις εισαγωγές.(Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων 2007).

Τα είδη της καλλιεργούμενης τριανταφυλλιάς μπορούν να χωριστούν σε 7 κατηγορίες:

- Υβρίδια τσαγιού. Είναι η πλέον δημοφιλής κατηγορία και καλλιεργείται με σκοπό την παραγωγή δρεπτών ανθέων.
- Πολυανθή. Διαθέτουν μικρότερα σε μέγεθος, αλλά περισσότερα σε αριθμό άνθη σε σχέση με τα υβρίδια τσαγιού.
- Γλαστρικά φυτά. Χρησιμοποιούνται κυρίως για τον καλλωπισμό χώρων, καθώς το ύψος τους κυμαίνεται γύρω στα 50 εκατοστά.

- Μίνι φυτά. Έχουν την ίδια χρήση με τα γλαστρικά, αλλά το ύψος τους είναι μικρότερο.
- Φυτά εδαφοκάλυψης. Αυτά αναπτύσσονται οριζόντια και χρησιμοποιούνται κυρίως στον κλάδο της κηποτεχνίας.
- Αναρριχώμενα φυτά. Είναι φυτά με κάθετη ανάπτυξη και χρησιμοποιούνται για την κάλυψη τοίχων, περιφράξεις, κατασκευή υποστέγων κ.α.
- Θαμνώδη φυτά με χρήση στην κηποτεχνία.

Πέρα από την καλλιέργεια της τριανταφυλλιάς για τα άνθη της και τη χρήση της στην κηποτεχνία, πολύ σημαντική είναι η συνεισφορά της στους κλάδους της αρωματοποιίας και της κοσμετολογίας. Το αιθέριο έλαιο της χρησιμοποιείται εκτεταμένα για την παραγωγή αρωμάτων, καλλυντικών, σαπουνιών κ.α. Τα πέταλα του άνθους της τριανταφυλλιάς συναντώνται συχνά και στη μαγειρική και ζαχαροπλαστική.

1.2.Πολλαπλασιασμός.

Όπως είναι φανερό η καλλιέργεια της τριανταφυλλιάς είναι ένα θέμα που απασχολεί πολύ τον κλάδο της ανθοκομίας και ως συνέπεια ο πολλαπλασιασμός της είναι ένα από τα σημαντικότερα αντικείμενα με τα οποία ασχολούνται οι ερευνητές. Μπορεί να πολλαπλασιαστεί είτε εγγενώς με σπόρο, είτε αγενώς με μοσχεύματα μαλακού ξύλου, με εμβολιασμό και με ιστοκαλλιέργεια. Ο πολλαπλασιασμός με σπόρο δεν προτιμάται και γίνεται κυρίως για γενετική βελτίωση των φυτών. Ο εγγενής πολλαπλασιασμός είναι αυτός που είναι περισσότερο διαδεδομένος για την επιχειρηματική παραγωγή φυτών.

1. Μοσχεύματα μαλακού ξύλου. Προέρχονται κυρίως από ετήσιους βλαστούς που κόβονται από τα μητρικά φυτά σε μήκος 20 εκατοστών. Η καλύτερη εποχή για την λήψη των μοσχευμάτων είναι κατά την άνοιξη, δηλαδή κατά την περίοδο αύξησης και ανάπτυξης των φυτών. Συγκεκριμένα για την τριανταφυλλιά, μοσχεύματα μπορούν να λαμβάνονται από το Μάιο μέχρι τον Οκτώβριο όταν τα μητρικά φυτά αναπτύσσονται στην ύπαιθρο, ενώ για τα θερμοκηπιακά φυτά, η λήψη μπορεί να γίνεται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Τα μοσχεύματα απολυμαίνονται και αφαιρούνται τα αγκάθια και οι οφθαλμοί, εκτός των δύο κορυφαίων. Έπειτα, τοποθετούνται σε μέσο ριζοβολίας, συνήθως σε περλίτη, όπου σχηματίζεται κάλος

και στην πορεία το ριζίδιο. Μετά το σχηματισμό του ριζιδίου, τα φυτάρια μεταφέρονται σε φυτοδοχεία τύρφης ή σε κύβους πετροβάμβακα. Η ριζοβολία γίνεται μέχρι τέλος Μαρτίου, ενώ από Ιούνιο-Μάιο αρχίζει ο εμβολιασμός.

2. Εμβολιασμός. Ως εμβολιασμός, χαρακτηρίζεται η εργασία εκείνη κατά την οποία επιδιώκεται η ανάπτυξη ενός τμήματος φυτού πάνω στις ρίζες ή τους βλαστούς ενός άλλου. Με άλλα λόγια, είναι η ένωση δύο τμημάτων, δύο διαφορετικών φυτών με τέτοιο τρόπο ώστε να συνενώνονται και να αναπτύσσονται ως ένα. Έτσι το νέο φυτό που προκύπτει, αποτελείται από το κατώτερο τμήμα, που ονομάζεται υποκείμενο, και το ανώτερο ή προστιθέμενο τμήμα, το εμβόλιο. Υπάρχουν 2 μέθοδοι εμβολιασμού:

- Ο ενοφθαλμισμός, κατά τον οποίο το εμβόλιο που χρησιμοποιείται είναι τμήμα φλοιού με οφθαλμό από το επιθυμητό φυτό.
- Ο εγκεντρισμός, στον οποίο μεταμοσχεύουμε τμήμα βλαστού με οφθαλμό επί ενός άλλου βλαστού.

Ο εμβολιασμός είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως και αποσκοπεί στην υλοποίηση των παρακάτω :

- Αξιοποίηση υποκειμένων με επιθυμητές ιδιότητες (χρώμα άνθους, αντοχή σε ασθένειες κ.α).
- Πολλαπλασιασμός με ευρέως γνωστή τεχνική.
- Γρήγορη είσοδο στην ανθοφορία.
- Αντικατάσταση της υπάρχουσας ποικιλίας.
- Διαπίστωση προσβολής από ιώσεις σε φυτά δείκτες.

Η επιτυχία του εμβολιασμού συνδέεται με πολλούς παράγοντες, όπως είναι η σωστή τεχνική και η σωστή εποχή εμβολιασμού, όμως εξαρτάται άμεσα από τη βοτανική συγγένεια μεταξύ εμβολίου και υποκειμένου. Στην περίπτωση της τριανταφυλλιάς βέβαια, όταν μιλάμε για εμβολιασμό αναφερόμαστε συνήθως στην ένωση δύο διαφορετικών ποικιλιών του ίδιου είδους ή γένους. Επομένως, τα ποσοστά της αποτυχίας λόγω μη συγγενικής συμβατότητας είναι πολύ μικρά.

Για την πραγματοποίηση του εμβολιασμού, δηλαδή την εισαγωγή του εμβολίου στο υποκείμενο, πρέπει να προηγηθεί η τομή του υποκειμένου, η οποία θα υποδεχτεί το εμβόλιο. Για να ολοκληρωθεί η διαδικασία θα πρέπει η τομή αυτή να κλείσει και έτσι τα

δύο φυτικά μέρη να συνενωθούν. Γενικά, ο τραυματισμός των φυτικών ιστών επάγει κυτταρικές διαιρέσεις στην περιοχή του τραύματος. Η επαγόμενη από τον τραυματισμό μιτωτική δραστηριότητα συνήθως είναι αυτοπεριοριζόμενη. Μετά από λίγες διαιρέσεις τα κύτταρα που προκύπτουν σταματούν να διαιρούνται και επαναδιαφοροποιούνται.

Η επούλωση της πληγής αυτής επέρχεται από τη δράση του καμβίου. Στον πρωτογενή βλαστό (τρυφεροί, αναπτυσσόμενοι βλαστοί), το φλοίομα και το ξύλωμα ενώνονται μεταξύ τους αποτελώντας ένα ενιαίο σύστημα που λέγεται ηθμαγγειώδης δεσμίδα. Στα δικότυλα φυτά, ανάμεσα από το ξύλωμα και το φλοίομα υπάρχει ένας πρωτογενής μεριστωματικός ιστός που λέγεται δεσμικό κάμβιο. Σε ξυλώδεις, ώριμους βλαστούς συναντάται το δευτερογενές ξύλωμα και το δευτερογενές φλοίομα που προκύπτουν από δευτερογενή μεριστώματα (αγωγός καμβιακός δακτύλιος). Έτσι, προκύπτει ότι το κάμβιο είναι ένα λεπτό στρώμα κυττάρων που πολλαπλασιάζεται και παράγει εσωτερικά ξύλο και εξωτερικά φλοίο, με αποτέλεσμα να κλείνει τις πληγές των φυτών.

Η συνένωση του εμβολίου με το υποκείμενο γίνεται ακολουθώντας μια συγκεκριμένη διαδρομή, η οποία περιλαμβάνει και την επούλωση της τομής. Αρχικά, οι ιστοί των δύο τμημάτων έρχονται σε επαφή και ξεκινάει η παραγωγή παρεγχυματικών κυττάρων και ο σχηματισμός κάλου. Τα επόμενα κύτταρα που σχηματίζονται είναι τα νέα καμβιακά, τα οποία ενώνονται με τα ήδη υπάρχοντα. Τέλος, γίνεται η διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών και ο σχηματισμός συνδετικών αγωγών ιστών μεταξύ εμβολίου και υποκειμένου. Η διαδικασία αυτή για να ολοκληρωθεί χρειάζεται περίπου 1 μήνα.

Παρ' όλα αυτά, ο εμβολιασμός είναι μια δύσκολη, ανεπιθύμητη από τους καλλιεργητές και κουραστική διαδικασία (Horn, 1992). Απαιτεί αρκετό χρόνο και μέχρι να επουλωθεί, η τομή είναι είσοδος μικροοργανισμών και εστία μόλυνσεων. Έτσι, η συμβατική αυτή μέθοδος δεν είναι πια τόσο ικανοποιητική για τον πολλαπλασιασμό της τριανταφυλλιάς (Pati *et al.*, 2006).

3. Ιστοκαλλιέργεια. Με τη μέθοδο αυτή δημιουργούνται πολλοί βλαστοί (μικρομοσχεύματα) υπό ασηπτικές συνθήκες. Στη συνέχεια οι βλαστοί ριζοβολούν, αναπτύσσονται στην υδρονέφωση και μεταφυτεύονται σε φυτοδοχεία και τέλος σε

φυτώριο. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε ως “εργαλείο” για τον γρήγορο και μαζικό πολλαπλασιασμό διάφορων φυτών (Khan & Shaw, 1988). Μέσω αυτής προσφέρεται όχι μόνο γρήγορος πολλαπλασιασμός, αλλά και φυτά ελεύθερα από ασθένειες, καθώς και πεδίο εφαρμογής για την ανακάλυψη νέων ποικιλιών (Debergh & Read, 1990).

2.Ιστοκαλλιέργεια.

2.1.Ορισμός-Γενικά στοιχεία.

Φυτική ιστοκαλλιέργεια, κυτταροκαλλιέργεια ή καλλιέργεια *in vitro* ονομάζεται κάθε διαδικασία που αναφέρεται στην απομάκρυνση κυττάρων, ιστών ή οργάνων από ένα μητρικό φυτό και στη συνέχεια τη διατήρηση, την αύξηση και την ανάπτυξή τους ή την βελτίωσή τους σε ένα ελεγχόμενο, τεχνητό, ασηπτικό περιβάλλον καλλιέργειας. Το περιβάλλον αυτό, στοχεύει στον έλεγχο της φυσιολογικής λειτουργίας των ιστών και των φυτικών οργάνων. Ο εν λόγω έλεγχος επιτυγχάνεται με την εφαρμογή διάφορων φυσικών μεθόδων (π.χ τροποποίηση της θερμοκρασίας, του φωτισμού, της σύστασης της ατμόσφαιρας κ.α.), αλλά και με την προσθήκη χημικών ουσιών (θρεπτικά μέσα, ρυθμιστές ανάπτυξης κ.λπ.).

Ο μικροπολλαπλασιασμός των φυτών αποτελεί την κυριότερη πρακτική και εμπορική εφαρμογή της ιστοκαλλιέργειας φυτών και στηρίζεται στο φαινόμενο της ολοδυναμίας που διατυπώθηκε για πρώτη φορά από τους Schwann και Schleiden το 1838. Η εφαρμογή της ολοδυναμίας στις πρακτικές του μικροπολλαπλασιασμού επιτρέπει την αναπαραγωγή ενός ολόκληρου φυτού από κάθε κύτταρο κάθε φυτικού τμήματος, όσο μικρό και αν είναι αυτό. Όπου μπορεί να εφαρμοστεί, ο μικροπολλαπλασιασμός (ειδικά στα ανθοκομικά φυτά) δίνει πολύ μεγάλες αποδόσεις σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους.

Το φαινόμενο της ολοδυναμίας σχετίζεται με μία πολύ σημαντική ικανότητα που διαθέτουν τα φυτικά σωματικά κύτταρα. Αυτά, είναι σε θέση, αν καλλιεργηθούν σε ασηπτικό περιβάλλον, κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα και συνθήκες περιβάλλοντος, να αποδιαφοροποιηθούν, να επανεισέλθουν στον κυτταρικό κύκλο, να διαιρεθούν πολλές φορές και να δημιουργήσουν μία μάζα μη διαφοροποιημένων κυττάρων, η οποία

ονομάζεται κάλος. Έτσι, ένα φυτικό κύτταρο πολλαπλασιαζόμενο μπορεί να δώσει ένα ολόκληρο φυτό ανεξάρτητα αν το κύτταρο αυτό έχει προέλθει από φύλλο, βλαστό, ρίζα ή οφθαλμό.

Ο γονότυπος των φυτών επηρεάζει σημαντικά τα αποτελέσματά της ιστοκαλλιέργειας. Είδη τα οποία πολλαπλασιάζονται εύκολα αγενώς (δηλαδή με μοσχεύματα, καταβολάδες κ.λ.π.) ανταποκρίνονται καλά και στον μικροπολλαπλασιασμό. Αντίθετα όσα είδη δεν πολλαπλασιάζονται αγενώς (δηλαδή πολλαπλασιάζονται μόνο με σπόρο) ανταποκρίνονται με κάποια δυσκολία. Επίσης, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ιστοκαλλιέργεια δεν είναι μια μέθοδος κλωνοποίησης, καθώς τα παραγόμενα φυτά μπορεί να διαφέρουν σημαντικά τόσο μεταξύ τους όσο και με το μητρικό φυτό.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για διάφορους σκοπούς. Ο πολλαπλασιασμός των φυτών που πολλαπλασιάζονται δύσκολα με τις κλασσικές μεθόδους είναι ένας από αυτούς. Η δημιουργία και ο πολλαπλασιασμός φυτών απαλλαγμένων από ιώσεις είναι ένας ακόμη λόγος. Επίσης, χρησιμοποιείται για τη δημιουργία απλοειδών φυτών, καθώς και νέων γενοτύπων με μεταλλάξεις. Σημαντικός είναι ο ρόλος που παίζει ο μικροπολλαπλασιασμός στην έρευνα για θέματα φυσιολογίας και βιοχημείας φυτών.

2.2.Εφαρμογές της ιστοκαλλιέργειας και παράγοντες που την επηρεάζουν.

Οι εφαρμογές της ιστοκαλλιέργειας στον μικροπολλαπλασιασμό των φυτών μπορούν να ταξινομηθούν σε 3 κατηγορίες:

- Αναπαραγωγή των φυτών με τα έκφυτα να σχηματίζουν κάλο, δηλαδή να αποδιαφοροποιούνται, πριν διαφοροποιηθούν σε όργανα ή σωματικά έμβρυα (Εμμεση οργανογένεση ή σωματική εμβρυογένεση).
- Αναπαραγωγή των φυτών χωρίς την δημιουργία κάλου (Άμεση οργανογένεση ή σωματική εμβρυογένεση).
- Ειδικές εφαρμογές της ιστοκαλλιέργειας στη γενετική βελτίωση των φυτών.

Η ιστοκαλλιέργεια σαν τεχνική, όποια και αν είναι η εφαρμογή της, μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς παράγοντες και είναι πιθανόν μικρές μεταβολές στους χειρισμούς ή στο περιβάλλον να φέρουν αρνητικά αποτελέσματα για την καλλιέργεια.

Ωστόσο, τρεις είναι οι σημαντικότεροι παράγοντες που οδηγούν στην επιτυχία της ιστοκαλλιέργειας:

- Η σωστή επιλογή του μητρικού φυτού που θα αποτελέσει την πηγή των εκφύτων. Αρχικά, ο γονότυπος του φυτού παίζει τον σημαντικότερο ρόλο, καθώς κάποια φυτά έχουν υψηλή, ενώ άλλα χαμηλή απόκριση στους ιστοκαλλιεργητικούς χειρισμούς. Άλλοι πολύ κρίσιμοι παράγοντες είναι οι συνθήκες κάτω από τις οποίες έχει αναπτυχθεί το μητρικό φυτό (φωτισμός, θερμοκρασία, υγρασία), καθώς και η φυσιολογική κατάσταση και υγεία του φυτού (ηλικία, προσβολές από ασθένειες).
- Το ίδιο το έκφυτο. Το είδος του ιστού από τον οποίο προέρχεται είναι μεγάλης σημασίας, εφόσον διαφορετικοί φυτικοί ιστοί περιέχουν ποικιλία κυττάρων σε διαφορετική αναλογία (καλύτερα αποτελέσματα δίνουν τα κορυφαία μεριστώματα, ενώ χειρότερα οι ρίζες). Το κάθε είδος κυττάρου μπορεί να δώσει διάφορα αποτελέσματα και σε διαφορετικό βαθμό επιτυχίας, γι' αυτό πρέπει να επιλέγεται ορθά με βάση το επιθυμητό αποτέλεσμα. Τέλος, η ηλικία του ιστού από τον οποίο έχει προέλθει το έκφυτο είναι εξίσου σημαντικό κριτήριο (τα νεαρότερα έκφυτα αντιδρούν καλύτερα από τα γηραιότερα).
- Το περιβάλλον ή οι συνθήκες του μικροπολλαπλασιασμού. Αυτός ο παράγοντας περιλαμβάνει το θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο γίνεται η καλλιέργεια (τα ανόργανα άλατα, οι ρυθμιστές ανάπτυξης κ.α που περιέχονται σε αυτό), ο φωτισμός, η θερμοκρασία και το ατμοσφαιρικό περιβάλλον.

2.3.Προβλήματα της ιστοκαλλιέργειας.

Κατά την εκτέλεση των εργασιών στην διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας είναι πολύ πιθανό να παρατηρηθούν απώλειες της παραγωγής ή μείωση της ποιότητας των παραγόμενων φυτών. Τα προβλήματα που συναντώνται πιο συχνά στις ιστοκαλλιέργειες είναι τέσσερα και είναι τα εξής:

- Μολύνσεις των καλλιεργειών.
- Οξειδωση φαινολικών και καστανωση ιστών.
- Υαλοποίηση.

- Ατελής εγκλιματισμός των εκφύτων.

Οι μολύνσεις των ιστοκαλλιιεργειών αποτελούν το πιο συχνά εμφανιζόμενο πρόβλημα και επηρεάζουν σε τόσο μεγάλο βαθμό την καλλιέργεια που μπορούν να την καταστρέψουν ολοκληρωτικά. Η μόλυνση κατά κύριο λόγο προέρχεται από μύκητες και βακτήρια και οφείλεται είτε σε λανθασμένους χειρισμούς (ελλιπής αποστείρωση), είτε στο γεγονός ότι το θρεπτικό υπόστρωμα, με όλα τα οργανικά και ανόργανα στοιχεία που περιέχει, αποτελεί το ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αυτών.

Τα οξειδωμένα συστατικά, κυρίως πολυφαινολικής προέλευσης, είναι αυτά που προκαλούν τη χαρακτηριστικό σκούρο καστανό χρώμα στους ιστούς, αλλά και στο υπόστρωμα. Είναι αποτέλεσμα της καταπόνησης των φυτικών ιστών από τον τεμαχισμό, αλλά και από την απομάκρυνσή τους από το φυσικό τους περιβάλλον. Η περιεκτικότητα των φυτών σε φαινολικές ουσίες και η τάση τους να οξειδώνονται σχετίζονται πολύ με το φυτικό είδος. Η καστανώση είναι ένα πρόβλημα που εμφανίζεται συχνά στην ιστοκαλλιέργεια, όμως δεν σημαίνει απαραίτητα και την καταστροφή της και σχετίζεται με το βαθμό εξάπλωσής της. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος προτείνεται η αποφυγή περαιτέρω πληγών στα έκφυτα, η προσθήκη αντιοξειδωτικών και ειδικών απορροφητικών ουσιών, καθώς και ο μικροπολλαπλασιασμός σε υγρό υπόστρωμα, στο οποίο μειώνεται η ένταση του προβλήματος.

Η υαλοποίηση είναι ένα φαινόμενο κατά το οποίο τα αναγεννημένα *in vitro* φυτά εμφανίζουν ελλιπή διαμόρφωση της δομής τους, ιδιαίτερα του κυτταρικού τοιχώματος και των πλαστιδίων. Το πρόβλημα αυτό σχετίζεται άμεσα από το γονότυπο του φυτού και τα συστατικά του θρεπτικού υποστρώματος. Ένα προσβεβλημένο φυτό είναι σπάνια βιώσιμο. Η συχνότητα του φαινομένου μπορεί να μειωθεί με τη σωστή επιλογή του φυτικού είδους, καθώς και με την παρασκευή υποστρώματος όσο το δυνατόν λιγότερο ενισχυτικού του φαινομένου.

Ο ατελής εγκλιματισμός μπορεί να αφορά τον εγκλιματισμό του εκφύτου κατά την τοποθέτησή του στο θρεπτικό υπόστρωμα (ικανότητα αναγέννησης) ή το τελικό στάδιο πριν την οριστική έξοδο ενός αναγεννημένου φυτού στο περιβάλλον (σκληραγώγηση). Στην πρώτη περίπτωση, το έκφυτο που βρίσκεται σε κατάσταση καταπόνησης, δεν μπορεί να προσαρμοστεί στις νέες συνθήκες περιβάλλοντος, με

αποτέλεσμα να μην εμφανίζει δείγματα αύξησης και ανάπτυξης και να οδηγείται τελικά στη νέκρωση. Η λύση του προβλήματος μπορεί να έρθει από τις εναλλαγές στις συγκεντρώσεις των ορμονών του υποστρώματος. Στη δεύτερη περίπτωση, το αναγεννημένο φυτό, μετά τις πλήρως ελεγχόμενες συνθήκες της ιστοκαλλιέργειας δυσκολεύεται να εγκλιματιστεί στο περιβάλλον, κάτι που έχει ως συνέπεια τη μείωση της ποιότητάς του, ακόμα και το θάνατό του. Για να αποφευχθεί αυτό το φαινόμενο, τα φυτά μπαίνουν σταδιακά σε πραγματικές συνθήκες περιβάλλοντος, αφού πρώτα μεταφερθούν σε θερμοκήπιο με πολύ υψηλή σχετική υγρασία και χαμηλή ένταση φωτός.

3. Διαφοροποίηση-Σωματική εμβρυογένεση-Οργανογένεση.

3.1. Ορισμοί.

Κάτω από την επίδραση συγκεκριμένων ερεθισμάτων τα κύτταρα που καλλιεργούνται *in vitro* μπορούν να αποκτήσουν μια συγκεκριμένη δομή και λειτουργία η οποία μπορεί να διαφέρει εντελώς από την αρχική τους δομή. Για παράδειγμα, κύτταρα φύλλου μπορούν να μετεξελιχθούν σε κύτταρα ριζικών καταβολών. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται διαφοροποίηση *in vitro*. Στην περίπτωση κατά την οποία αποδιαφοροποιημένα κύτταρα (π.χ σε μορφή κάλου) αρχίσουν να διαφοροποιούνται ξανά, η διαδικασία ονομάζεται επαναδιαφοροποίηση. Η διαφοροποίηση μπορεί να εκφραστεί σε επίπεδο γενετικό, βιοχημικό και/ή μορφολογικό.

Η διαφοροποίηση *in vitro* μπορεί να ακολουθήσει δύο διακριτά μορφολογικά μονοπάτια, της οργανογένεσης ή της σωματικής εμβρυογένεσης. Κάθε μια από τις διαδικασίες αυτές μπορεί να συμβεί είτε άμεσα, πάνω στα καλλιεργούμενα έκφυτα, είτε έμμεσα, αφού προηγηθεί η αποδιαφοροποίηση και ο σχηματισμός κάλου.

Η σωματική εμβρυογένεση (somatic embryogenesis) είναι η διαδικασία εκείνη με την οποία σχηματίζονται εμβρυακές δομές χωρίς να έχει προηγηθεί καμία φάση γονιμοποίησης. Τα έμβρυα τα οποία δημιουργούνται ονομάζονται σωματικά ακριβώς επειδή προέρχονται από σωματικά κύτταρα (όπως π.χ. τα κύτταρα του φύλλου, του βλαστού ή της ρίζας) τα οποία δεν μπορούν να γονιμοποιηθούν.

Η οργανογένεση (organogenesis) είναι η διαδικασία η οποία τελικά οδηγεί στο σχηματισμό καταβολών οργάνων. Τα όργανα αυτά μπορούν να ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες οπότε και η οργανογένεση προσδιορίζεται ανάλογα με τον τύπο του παραγόμενου οργάνου. Έτσι διακρίνεται σε βλαστογένεση, ριζογένεση, οφθαλμογένεση, κ.λπ. Κατά την άμεση οργανογένεση ο σχηματισμός του νέου οργάνου αρχίζει από επιδερμικά ή υποδερμικά παρεγχυματικά κύτταρα από τα οποία προκύπτει το μεριστωματοειδές, δηλαδή μια ομάδα ταχέως διαιρούμενων κυττάρων που μοιάζουν με μεριστωματικά. Επίσης τα φυτά που αναγεννώνται μέσω οργανογένεσης αποτελούν μονοπολικές δομές, δηλαδή σχηματίζονται πρώτα οι βλαστοί και μετά οι ρίζες. Με τον τρόπο αυτό η τυχαία οργανογένεση διακρίνεται σαφώς από τη σωματική εμβρυογένεση, όπου η βλάστηση των εμβρύων δίνει ολοκληρωμένα φυτά διπολικής δομής με τον ταυτόχρονο σχηματισμό βλαστών και ριζών.

Η διαφοροποίηση περιλαμβάνει όλες τις προγραμματισμένες διεργασίες που προσδιορίζουν τη μορφογενετική έκφραση και τον φυσιολογικό ρόλο των κυττάρων, καθώς και των ιστών και των οργάνων που σχηματίζονται από αυτά. Η διαφοροποίηση και η μορφογένεση έχουν χρονικό και χωροταξικό χαρακτήρα και συμβαίνουν με γενετικώς προκαθορισμένες διεργασίες, που προσδιορίζονται από πληροφορίες που είναι κωδικοποιημένες στο γενετικό υλικό.

3.2.Διεργασίες που οδηγούν στην διαφοροποίηση.

3.2.1. Υποδοχή και μεταφορά σήματος.

Προκειμένου να αρχίσει κάθε διαδικασία που οδηγεί στην έκφραση της μορφογένεσης και καταλήγει στην διαφοροποίηση των κυττάρων, πρέπει να υπάρξει κάποιο ερέθισμα. Πρέπει να δοθεί το κατάλληλο σήμα στον κατάλληλο δέκτη-στόχο. Δηλαδή, θα πρέπει να ενεργοποιηθεί η αντίστοιχη για κάθε διαδικασία οδός υποδοχής και μεταφοράς σήματος. Έτσι, κάθε παράγοντας που επηρεάζει τη συμπεριφορά των φυτών ή στην περίπτωση της ιστοκαλλιέργειας, των φυτικών κυττάρων, πρέπει για να δράσει να γίνει “αντιληπτό” από αυτά. Επομένως, για να δράσει κάθε εξωγενής (φώς, θερμοκρασία κ.α) ή ενδογενής (ορμόνες) παράγοντας, απαιτείται:

- Να γίνει η υποδοχή του σήματος από τον αντίστοιχο υποδοχέα (εξειδικευμένες πρωτεΐνες).
- Να γίνει η μεταφορά του σήματος στον πρώτο αποδέκτη.
- Να γίνει πολλαπλασιασμός της έντασης του σήματος, να μεταφερθεί περαιτέρω με δευτερογενείς αγγελιοφόρους και πιθανόν να συνδυαστεί με άλλο μονοπάτι μεταφοράς σήματος.
- Να επιτευχθεί η αναγνώριση ου σήματος από τον τελικό δέκτη-στόχο προκειμένου να προκληθεί η γονιδιακή έκφραση.

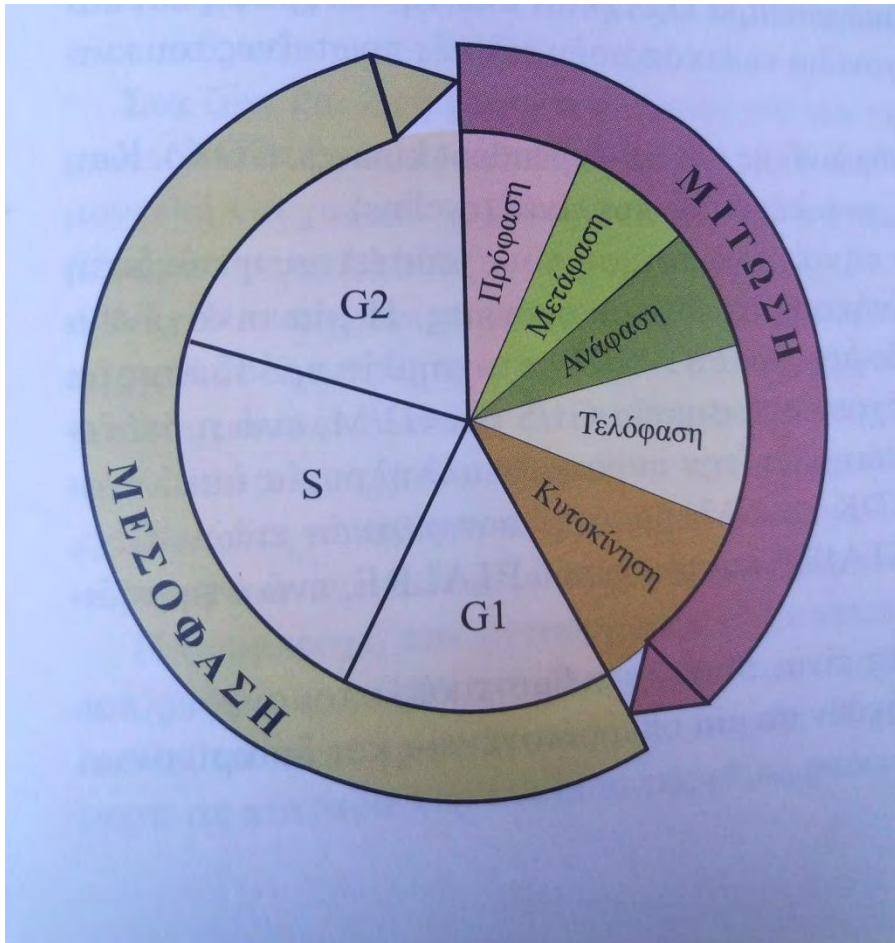
3.2.2. Αύξηση.

Η αύξηση είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα κάθε κυττάρου, οργάνου και οργανισμού και αφορά στην ποσοτική μεταβολή των δομικών και λειτουργικών τους συστατικών. Σε επίπεδο κυττάρου, η αύξηση περιλαμβάνει την κυτταρική διαίρεση, την κυτταρική αύξηση, τη δημιουργία των οργανιδίων και τη σύνθεση των κυτταρικών συστατικών. Ο έλεγχος της κυτταρικής αύξησης είναι σημαντικός για τη μορφογένεση και την οργανογένεση, αφού η μορφολογία των φυτικών οργάνων προσδιορίζεται από το μέγεθος, το σχήμα και τον αριθμό των κυττάρων. Βασική προϋπόθεση για την κυτταρική αύξηση είναι αρχικά η χαλάρωση των κυτταρικών τοιχωμάτων, η οποία συνοδεύεται από την απόθεση νέων κυτταροτοιχωματικών συστατικών, είσοδο νερού και αύξηση του μεγέθους των χυμοτοπίων. Η κυτταρική αύξηση επάγεται από τις φυτοορμόνες (βασική θέση κατέχουν οι αυξίνες που φαίνεται να ενεργούν σημαντικά στην χαλάρωση του κυτταρικού τοιχώματος) και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Επιγραμματικά, στη διαδικασία της αύξησης συμμετέχουν:

- Η μηχανική των κυτταρικών τοιχωμάτων.
- Η υδραυλική των κυττάρων.
- Οι βιοχημικές διεργασίες που επηρεάζουν τις ιδιότητες των κυτταρικών τοιχωμάτων.
- Η έκφραση των γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στις παραπάνω δομές και λειτουργίες.

3.2.3. Κυτταρική διαίρεση.

Το μέγεθος κάθε οργάνου είναι συνάρτηση του αριθμού και του μεγέθους των κυττάρων από τα οποία αποτελείται. Η διαίρεση των κυττάρων, σε συνδυασμό με την αύξηση του κυτταρικού όγκου, συμμετέχει στην αύξηση του μεγέθους των φυτικών κυττάρων. Η κυτταρική διαίρεση επάγεται τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς παράγοντες. Οι αυξίνες και οι κυτοκινίνες είναι οι σημαντικότερες φυτορμόνες που επιδρούν στην κυτταρική διαίρεση. Οι 2 τύποι ορμονών τροποποιούν, μέσω φωσφορυλίωσης, την ενεργότητα των κυκλινών A και B, δηλαδή ενζύμων που επιδρούν στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, κυρίως στις φάσεις G_1 και G_2 (Εικόνα 1). Στις φάσεις αυτές καθορίζεται αν το κύτταρο θα προχωρήσει στη μίτωση (οπότε και θα πολλαπλασιαστεί) ή όχι. Οι αυξίνες επιδρούν σε όλο τον κυτταρικό κύκλο ενώ οι κυτοκινίνες επηρεάζουν κυρίως στη φάση G_1 .



Εικόνα 1. Φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

3.2.4. Ανάπτυξη.

Η ανάπτυξη περιλαμβάνει όλες τις συντονισμένες διεργασίες που επιτρέπουν την κυτταρική διαίρεση, τη δημιουργία μεγάλου αριθμού νέων κυττάρων και τη διαφοροποίησή τους για τη δημιουργία εξειδικευμένων ιστών και οργάνων. Είναι δηλαδή, το σύνολο των διεργασιών που απαιτούνται για την έκφραση της μορφογένεσης. Η ανάπτυξη, σε αντίθεση με την αύξηση, έχει περισσότερο ποιοτικό παρά ποσοτικό χαρακτήρα. Στα πολυετή φυτά, η αναπτυξιακή διαδικασία συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του φυτού.

3.3.Ιστοκαλλιέργεια και οργανογένεση στην τριανταφυλλιά.

Η ιστορία της ιστοκαλλιέργειας της τριανταφυλλιάς ξεκινάει το 1945, όταν οι Nobecourt και Kofler κατάφεραν να αναπτύξουν κάλο και ρίζα σε έκφυτα οφθαλμών. Οι μελέτες για την καλλιέργεια κυττάρων με σκοπό να κατανοηθούν τα φαινόμενα της διαφοροποίησης και της αναγέννησης ξεκίνησαν από τους Nickell and Tulecke το 1959 και τον Weinstein με την ερευνητική του ομάδα το 1962. Η πρώτη οργανογένεση βλαστού από κάλο καταγράφηκε το 1967 από τον Hill στο υβρίδιο τριανταφυλλιάς “Thedoctor” που προερχόταν από τη διασταύρωση υβριδίων κλάσης Tea και υβριδίων κλάσης Hybrid Perpetual.

Ένα από τα θέματα που απασχόλησε πολύ τους ερευνητές ήταν η επιρροή του γενότυπου των φυτών στην αναγέννηση των βλαστών (Horn, 1992). Τα διαφορετικά αποτελέσματα που έδινε η κάθε ποικιλία, η εμπορική αξία κάθε ποικιλίας και συνεπώς η ανάγκη για γρήγορο πολλαπλασιασμό και βελτιστοποίηση των φυτών, οδήγησαν στην διεξαγωγή πολλών μελετών και πειραμάτων για να βρεθούν οι κατάλληλες ποικιλίες για μικροπολλαπλασιασμό. Σε πρόσφατες μελέτες, αποδείχθηκε ότι υπάρχουν γένη τριανταφυλλιάς που είναι υπεύθυνα για τα πολύ καλά ποσοστά πολλαπλασιασμού των βλαστών (Tantikanjana *et al.*, 2001).

Αρχικό μέλημα των ερευνών ήταν να διαπιστωθεί ποιες ποικιλίες δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς την βλαστογένεση, αλλά και την μετέπειτα ριζογένεση, καθώς και ποια τμήματα του φυτού δίνουν τα καλύτερα έκφυτα για αυτό το σκοπό. Από τα πειράματα που διεξήχθησαν μέσα στα χρόνια αποδείχθηκε ότι τα είδη Rosahybrida (Skirvin & Chu, 1979, Bressan *et al.*, 1982, Rout *et al.*, 1990, Carelli & Echeverrigaray, 2002) και Rosa multiflora (Elliot, 1970, Graifenberg *et al.*, 1975) είναι τα πιο αποδοτικά και τα έκφυτα που προέρχονται από αυτά μπορεί να είναι μεριστώματα κορυφής ή μασχαλιαία, πλευρικοί οφθαλμοί, τμήματα βλαστού κ.α με εξίσου ικανοποιητικά αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, κάποιες από τις ποικιλίες που βρέθηκε ότι δίνουν τα επιθυμητά αποτελέσματα είναι οι: Tropicana (Khosh-Khui & Sink, 1982), Bridal Pink (Khosh-Khui & Sink, 1982), Sweetpromise (Marcelis van Acker & Scholten, 1995), Baronesse (Carelli & Echeverrigaray, 2002) κ.α. Επίσης, κάποια ήδη που δίνουν αρκετά καλά αποτελέσματα είναι τα: Rosa indica (Graifenberg *et al.*, 1975), Rosa

damascena (Khosh-Khui & Sink, 1982, Kumar *et al.*, 2001, Pati *et al.*), Rosa chinesis (Chu *et al.*, 1993), Rosa centifolia (Ganga *et al.*, 1998) κ.α.

Ο συνδυασμός των διαφορετικών φυτορυθμιστικών ουσιών στις διάφορες αναλογίες είναι αυτός που καθορίζει την εξέλιξη της ιστοκαλλιέργειας και οδηγεί στην οργανογένεση. Είναι γνωστό ότι για την αναγέννηση βλαστών η συγκέντρωση της κυτοκινίνης πρέπει να είναι αρκετά μεγαλύτερη από αυτή της αυξίνης. Αυτό όμως που ανακάλυψαν οι ερευνητές είναι ότι ο ίδιος συνδυασμός φυτορυθμιστικών ουσιών και οι ίδιες μεταχειρίσεις των δειγμάτων μπορούν να δώσουν τελείως διαφορετικά αποτελέσματα με βάση την ποικιλία από την οποία προέρχονται τα έκφυτα. Μία σημαντική έρευνα που έγινε πάνω στο συγκεκριμένο αντικείμενο είναι αυτή των Carelli και Echeverrigaray το 2002, όπου μελετήθηκαν τα έκφυτα 10 διαφορετικών ποικιλιών τριανταφυλλιάς, τα οποία εγκαταστάθηκαν στο ίδιο ακριβώς υπόστρωμα και έλαβαν τις ίδιες ακριβώς μεταχειρίσεις. Οι παρατηρήσεις που πήραν διέφεραν αρκετά μεταξύ τους, με την ποικιλία Baronesse να σχηματίζει 2,88 βλαστούς ανά έκφυτο και μέσο όρο μήκους του βλαστού 1,49 εκ. και να εμφανίζεται ως η πιο αποδοτική ποικιλία και την Vegas να είναι η τελευταία στη λίστα με 1,22 βλαστούς ανά έκφυτο και 0,88 εκ. μέσο όρο μήκους βλαστού.

4.Φυτορυθμιστικές ουσίες.

4.1.Γενικά στοιχεία.

Οι φυτορυθμιστικές ουσίες είναι οργανικές ουσίες που σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις προάγουν, παρεμποδίζουν ή τροποποιούν μερικά ποσοτικά ή ποιοτικά χαρακτηριστικά της αύξησης. Αυτές, χωρίζονται σε 2 κατηγορίες:

- Τους φυσικούς ρυθμιστές ανάπτυξης (φυτορμόνες).
- Τους συνθετικούς ρυθμιστές ανάπτυξης.

Ορμόνη θεωρείται κάθε βιομόριο που πληροί 3 όρους:

- Συντίθεται σε μικρές ποσότητες σε ένα κύτταρο ή μία ομάδα κυττάρων (ιστό ή όργανα).
- Μεταφέρεται σε άλλα κύτταρα, ιστούς ή όργανα, όπου δρα.
- Για τη δράση της απαιτούνται συνήθως μικρές συγκεντρώσεις.

Για την εκδήλωση της δράσης, πρέπει:

- Η ορμόνη να βρίσκεται στην απαιτούμενη ενδογενή συγκέντρωση.
- Ο αντίστοιχος υποδοχέας να αναγνωρίσει και να προσδεθεί με την ορμόνη.
- Το σήμα της ορμόνης αν είναι ικανό να προκαλέσει αντίδραση, για τη μεγέθυνση και μεταφορά του σήματος στους στόχους δράσης.

Σήμερα υπάρχουν αρκετές αναγνωρισμένες ομάδες αυξητικών ουσιών, όμως οι πρώτες που αναγνωρίστηκαν επίσημα και θεωρούνται οι πιο βασικές είναι 5:

- Οι αυξίνες.
- Οι κυτοκινίνες.
- Οι γιββερελλίνες.
- Το αιθυλένιο.
- Το αμπισισικό οξύ.

Οι φυτορμόνες είναι η σημαντικότερη κατηγορία ενώσεων που προστίθεται στο θρεπτικό διάλυμα και είναι αυτές που καθορίζουν την κατεύθυνση της καλλιέργειας, αφού διεγείρουν κάποιες λειτουργίες του φυτικού κυττάρου και αναστέλλουν άλλες. Οι αυξίνες και οι κυτοκινίνες έχει αποδειχθεί ότι είναι μακράν οι πιο σημαντικές φυτορρυθμιστικές ουσίες για τη ρύθμιση της ανάπτυξης και της μορφογένεσης των φυτικών ιστών. Δεν ισχύει όμως το ίδιο και με το αιθυλένιο που θεωρείται καταστροφικός παράγοντας στην ιστοκαλλιέργεια και για αυτό δεν προστίθεται ποτέ εξωγενώς. Αντιθέτως, υπάρχουν τρόποι για την απομάκρυνσή του από τις καλλιέργειες *in vitro* (Konstas & Kintzios 2003).

Ωστόσο, η δράση των ορμονών δεν είναι μία απλή αντίδραση. Οι φυτορμόνες μπορεί να συμμετέχουν σε αλυσίδα μεταφοράς σήματος, με ενδεχομένως πολλαπλούς αποδέκτες και ποικίλες δράσεις, έτσι ώστε το κύτταρο ή η ομάδα κυττάρων να οδηγούνται σε ειδική αναπτυξιακή οδό.

Ένας φυτικός ρυθμιστής αύξησης χαρακτηρίζεται από τη δράση του και όχι από τη χημική του δομή, για το λόγο αυτό μπορούν να παρουσιαστούν ουσίες μέσα στην ίδια ομάδα με τελείως διαφορετική δομή μεταξύ τους.

Η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίησή τους γίνεται με χρωματογράφους υψηλής πιστότητας και ευαισθησίας, ο κυτταρικός εντοπισμός τους με ανοσοχημικές μεθόδους, ενώ οι μοριακοί μηχανισμοί βιοσύνθεσης και δράσης διερευνούνται με τις μεθόδους της μοριακής βιολογίας και της μοριακής γενετικής.

4.2.Αυξίνες.

4.2.1.Ιστορικά-Γενικά στοιχεία.

Οι αυξίνες χρησιμοποιούνται ευρέως στις καλλιέργειες φυτικών ιστών και είναι αναπόσπαστο κομμάτι των θρεπτικών υποστρωμάτων. Κυρίως σε συνδυασμό με τις κυτοκινίνες, προάγουν την κυτταρική διαίρεση σε ιστοκαλλιέργειες κάλου, ρυθμίζουν την κατεύθυνση της μορφογένεσης και συμμετέχουν σε πολλά άλλα αναπτυξιακά φαινόμενα.

Η πρώτη ουσία που αναγνωρίστηκε ως αυξίνη ήταν το ινδολ-3-οξικό οξύ (indoleaceticacid, IAA). Αρκετές άλλες αυξίνες αποκαλύφθηκαν αργότερα σε ανώτερα φυτά, όμως το IAA είναι μακράν η αφθονότερη και η πλέον σημαντική για το φυτό φυσική αυξητική ορμόνη. Κάποιες από τις φυσικές αυξίνες που συναντώνται στα φυτά είναι το ινδολ-3-βουτανικό οξύ (indolebutyricacid, IBA), το 4-χλώρο-IAA (4Cl-IAA) κ.α , ενώ 2 από τις συνθετικές αυξίνες που χρησιμοποιούνται κυρίως στη γεωργία είναι το 2,4 D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) και το ναφθαλινικό οξύ (naphthaleneaceticacid, NAA).

Ιστορικά, η ανακάλυψη των αυξινών ξεκίνησε τον 19^ο αιώνα τυχαία μέσω της μελέτης των αιτιών του φωτοτροπισμού και του γεωτροπισμού, όταν βρέθηκε ότι η κορυφή του κολεόπτλου (μεταμορφωμένο φύλλο που καλύπτει και προστατεύει τα νεαρά πρωτογενή φύλλα αγρωστώδους αρτίβλαστου) ήταν απαραίτητη για την έκφραση του τροπισμού στο υπόλοιπο κολεόπτλο. Αυτό συνέβαινε εξαιτίας μίας ουσίας που συντίθενταν στα κύτταρα του μεριστώματος. Αρχικά απομονώθηκε η ουσία αυτή το

1928 από τον Went, ο οποίος την ονόμασε αυξίνη, από το ελληνικό αυξάνω και η οποία αναγνωρίστηκε ως το ινδολ-3-οξικό οξύ (IAA) από τους Kong και Kostermans το 1934 και τον Thimann το 1935.

4.2.2.Βιοσύνθεση των αυξινών.

Η βιοσύνθεση του IAA σχετίζεται με τους ταχέως διαιρούμενους και αυξανόμενους ιστούς, ιδιαίτερα εκείνους των βλαστών. Σημαντικά σημεία σύνθεσης του IAA θεωρούνται τα επάκρια μεριστώματα των βλαστών και τα νεαρά φύλλα και δευτερευόντως τα επάκρια μεριστώματα των ριζών (Ljung *et al.*, 2001). Η βιοσύνθεση αυτή μπορεί να γίνει μέσω διαφόρων οδών. Ως πρόδρομα μόρια της βιοσύνθεσης του IAA λειτουργούν το αμυνοξυτριπτοφάνη και το πρόδρομο μόριό της, η ινδολο-3-φωσφογλυκερόλη. Οι 3 βασικότερες οδοί της βιοσύνθεσης του IAA από την τρυπτοφάνη που φαίνονται στην Εικόνα 2, είναι:

- Η οδός του ινδολο-3-πυροσταφυλικού οξέος (indole-3-pyruvic acid, IPA), η οποία φαίνεται να λειτουργεί στα περισσότερα φυτά. Μέσω αυτής το IPA σχηματίζεται από την τρυπτοφάνη με τη δράση της αμινοτρανσφεράσης της τρυπτοφάνης (Stepanova *et al.* 2008, Tao *et al.* 2008).
- Η οδός της ινδολ-3-ακεταλδοξίμης (indol-3-acetaldoxime), όπου γίνεται βιοσύνθεση του IAA δια μέσου του ινδολ-3-ακετονιτριλίου.
- Η οδός της τρυπταμίνης (tryptamine [TRM] pathway) θεωρείται ότι παράγει ινδολο-3-ακεταλδοξίμη (IAOx) ως ενδιάμεσο προϊόν κατά τη βιοσύνθεση του IAA.

Κάποια πειράματα έχουν δείξει ότι το IAA μπορεί να σχηματιστεί ακόμη και χωρίς την ύπαρξη τρυπτοφάνης (Slovin *et al.*, 1999).

Άλλη ενδογενής αυξίνη είναι το ινδολ-3-βουτυρικό οξύ (IBA). Το IBA συντίθεται από το IAA με αλυσιδωτές αντιδράσεις επιμήκυνσης, αντίστοιχων με αυτών που λαμβάνουν χώρα στην επιμήκυνση των λιπαρών οξέων, με τη δράση του ενζύμου της συνθάσης του IBA.

Τα μόρια της αυξίνης υπάρχουν στα φυτά σε συζευγμένη μορφή. Αυτό σημαίνει ότι η αυξίνη συνδέεται ομοιοπολικά με ενώσεις υψηλής ή χαμηλής μοριακής μάζας, ιδιαίτερα στα σπέρματα και σε αποταμιευτικά όργανα. Το IAA μπορεί να συζευχθεί με

πολλές διαφορετικές ενώσεις, όπως αμινοξέα, σάκχαρα, πεπτίδια, μείγματα γλυκανών ή γλυκοπρωτεΐνες.

4.2.3.Μεταφορά μέσα στο φυτό.

Η μεταφορά της αυξίνης μέσα στα φυτά γίνεται προς μια μόνο κατεύθυνση και κινείται κατά κανόνα από την κορυφή προς τη βάση (βασιπεταλικά) μέσω των παρεγχυματικών κυττάρων του αγωγού ιστού. Αυτός ο τύπος μεταφοράς, ονομάζεται πολική μεταφορά και η αυξίνη είναι η μοναδική φυτική αυξητική ορμόνη που είναι ξεκάθαρο πως μεταφέρεται με αυτόν τον τρόπο. Η μεταφορά αυτή, όπως είναι λογικό για μία τόσο σημαντική διεργασία, ρυθμίζεται από πολλούς μηχανισμούς τόσο κατά τη μεταγραφή των γονιδίων όσο και από μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς. Σημαντικές είναι οι αλληλεπιδράσεις με άλλες ορμόνες, η διακίνηση των πρωτεϊνών, καθώς και η ύπαρξη φλαβονοειδών.

4.2.4.Είσοδος της αυξίνης στο κύτταρο.

Η είσοδος της αυξίνης στο κύτταρο επιτυγχάνεται με δύο μηχανισμούς:

- Με παθητική διάχυση της πρωτονιωμένης μορφής δια μέσου της φωσφολιπιδικής στιβάδας.
- Με ενεργή μεταφορά του ανιόντος IAA^- , δια μέσου συμμεταφοράς H^+ .

Μετά την είσοδο της αυξίνης στο κυτταρόπλασμα, όλη σχεδόν η ποσότητά της διασπάται και βρίσκεται υπό την μορφή ανιόντος. Έτσι, επειδή η μεμβράνη είναι λιγότερο περατή από το ανιόν, το λογικό θα ήταν η αυξίνη να συσσωρευόταν στο κυτταρόπλασμα. Ωστόσο, η αυξίνη βγαίνει από το κύτταρο, με τη βοήθεια μίας ειδικής πρωτεΐνης εξόδου που εντοπίζεται στο βασικό τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης (Κ. Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).

4.2.5.Δράσεις αυξινών.

Αφού συντεθούν και μεταφερθούν σε όλο το ύψος του φυτού και στα σημεία στα οποία είναι απαραίτητες, οι αυξίνες αρχίζουν να δρουν. Οι δράσεις των αυξινών μέσα στο φυτό χωρίζονται σε δράσεις σε επίπεδο κυττάρου και σε επίπεδο οργανισμού.

Σε επίπεδο κυττάρου, οι δράσεις τους συνδέονται με:

- Την κυτταρική διαίρεση. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σε συνδυασμό με τις κυτοκινίνες, οι αυξίνες προάγουν την κυτταρική διαίρεση.
- Την κυτταρική αύξηση. Υπάρχει μια γενική συμφωνία πως η αυξίνη προκαλεί αύξηση της ικανότητας τάνυσης του κυτταρικού τοιχώματος, με αποτέλεσμα την χαλάρωσή του και την επιμήκυνση των κυττάρων.
- Την διαφοροποίηση των κυττάρων και των ιστών.

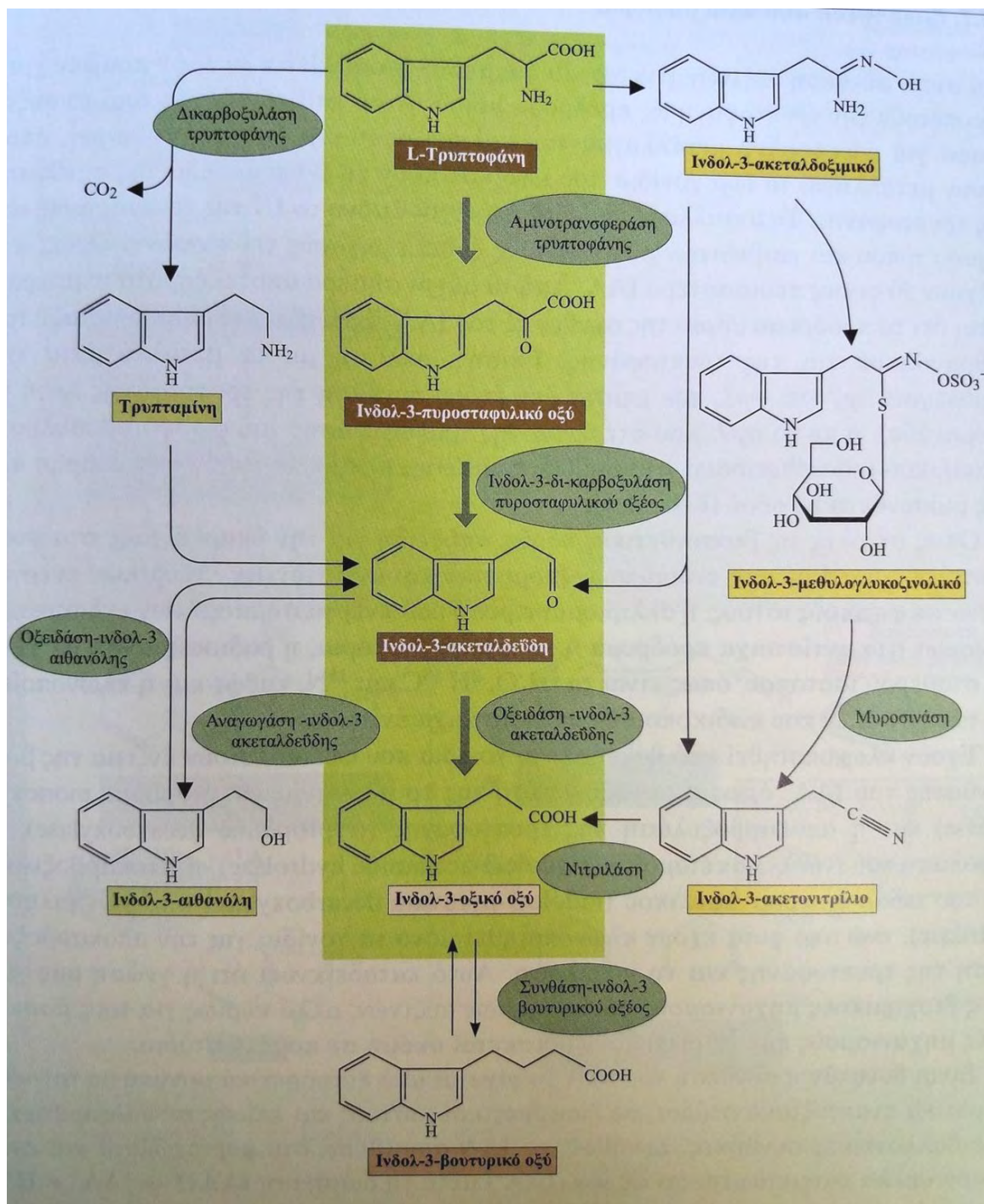
Όσον αφορά στο επίπεδο οργανισμού, οι αυξίνες φαίνονται να συνδέονται με:

- Τη δημιουργία και τη διατήρηση πολικής αύξησης.
- Τη ρύθμιση της επάκριας κυριαρχίας.
- Την ανάπτυξη των ανθικών οφθαλμών και τη φυλλόταξη.
- Τον σχηματισμό πλάγιων και επιγενών ριζών.
- Την καθυστέρηση της αποκοπής των φύλλων.
- Την καρπόδεση, ανάπτυξη και ωρίμανση των καρπών.
- Την εμφάνιση τροπισμών (φωτοτροπισμός, βαρυτροπισμός, θιγμοτροπισμός).

Οι μηχανισμοί δράσης των αυξινών δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως και υπάρχουν ακόμα κομμάτια που αποτελούν τρέχοντα ερευνητικά θέματα. Αυτό που γνωρίζουμε είναι ότι η δράση τους ξεκινάει με τη σύνδεσή τους με ειδικές πρωτεΐνες (auxinbindingproteins, ABP). Με τη σύνδεση αυτή, ξεκινάει η έκφραση γονιδίων, τα οποία εκφράζονται ως απόκριση στην αύξηση των συγκεντρώσεων της αυξίνης.

Τέλος, για να διατηρηθεί η ενδοκυτταρική συγκέντρωση των ορμονών σε άριστο επίπεδο μέσα στο φυτό, είναι απαραίτητα:

- Η ρύθμιση της ταχύτητας βιοσύνθεσης των ορμονών.
- Η ρύθμιση της ταχύτητας αποδόμησης των ορμονών, μέσω της οξειδωσης του ινδολικού δακτυλίου.
- Η σύζευξη των ορμονών με διάφορα βιομόρια, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω.



Εικόνα 2. Οδοί βιοσύνθεσης της αυξίνης από τρυπτοφάνη.

4.3.Κυτοκινίνες

4.3.1.Ιστορικά-Γενικά στοιχεία.

Οι κυτοκινίνες ανακαλύφθηκαν τη δεκαετία του 1950 κατά την προσπάθεια του χημικού προσδιορισμού του παράγοντα που είναι υπεύθυνος για την διέγερση της κυτταρικής διαίρεσης, ή αλλιώς κυτοκίνησης, από όπου πήραν και το όνομα τους. Η πρώτη κυτοκινίνη που ανακαλύφθηκε ήταν η συνθετικά ανάλογη ουσία κινετίνη, η οποία ανακαλύφθηκε ως προϊόν διάσπασης του DNA από τον Folke Skoog και τους συνεργάτες του και δεν συναντάται στη φύση. Η πρώτη φυσική κυτοκινίνη που βρέθηκε ήταν η ζεατίνη, η οποία υπάρχει στο εκχύλισμα του ανώριμου ενδοσπερμίου του αραβόσιτου.

Οι κυτοκινίνες που χρησιμοποιούνται συνήθως στις ιστοκαλλιέργειες είναι η 6-φουρφουρυλάμινο πουρίνη ή κινετίνη (AP ή KIN), η 6-βενζυλαμινοπουρίνη ή βενζυλαδενίνη (BAP ή BA), η 2-ισοπεντενυλαδενίνη (2iP) και η ζεατίνη (ZEA). Η ζεατίνη και η 2iP είναι φυσικές κυτοκινίνες, ενώ η BAP και η KIN είναι συνθετικές.

4.3.2.Βιοσύνθεση των κυτοκινινών.

Οι κυτοκινίνες συντίθενται στο κορυφαίο βλαστικό μερίστωμα, στους αναπτυσσόμενους σπόρους και, κυρίως, στις ρίζες. Η βιοσύνθεσή τους λαμβάνει χώρα κατά κύριο λόγο στα πλαστίδια. Μετρήσεις, όμως, έχουν δείξει πως υπάρχουν πολλαπλές πηγές βιοσύνθεσης κυτοκινινών σε διάφορα τμήματα του φυτού (Miyawaki *et al.*, 2004).

Οι πλευρικές αλυσίδες των φυσικών κυτοκινινών δομούνται μερικώς από μονάδες ισοπρενίου. Το ισοπρένιο εμφανίζει παρόμοια δομή με τις πλευρικές αλυσίδες της ζεατίνης και της iP. Οι αλυσίδες αυτές συντίθενται από ένα παράγωγο του ισοπρενίου. Η πρόδρομη ουσία για το σχηματισμό αυτών των ισοπρενικών δομών στις κυτοκινίνες είναι το διφωσφορικό-διμεθυλαλλύλιο (DMAAP), το οποίο παράγεται είτε από την οδό του μεβαλονικού οξέος είτε από την οδό της φωσφορικής μεθυλοερυθριτόλης (MEP). Η πρώτη καθοριστική αντίδραση στη βιοσύνθεση των κυτοκινινών είναι η προσθήκη της ισοπεντενυλικής πλευρικής αλυσίδας, από το

DMAAP σε ένα τμήμα αδενοσίνης (ATP ή ADP). Τα προϊόντα αυτών των αντιδράσεων μετατρέπονται σε ζεατίνη από μία μονοοξυγονάση του κυττοχρώματος P450. Η βιοσύνθεση των κυτοκινινών φαίνεται στην Εικόνα 3.

Τις κυτοκινίνες τις συναντούμε σε ελεύθερη, αλλά και σε δεσμευμένη μορφή. Οι βιολογικά δραστικές κυτοκινίνες υπάρχουν κυρίως ως ελεύθερα μόρια, που δηλαδή δεν ενώνονται ομοιοπολικά με κανένα μακρομόριο.

4.3.3.Μεταφορά κυτοκινινών μέσα στο φυτό.

Η μεταφορά των ορμονών αυτών μπορεί να γίνει τόσο τοπικά όσο και σε μεγάλες αποστάσεις. Μετά από πειράματα, έχει αποδειχθεί ότι οι μεταφερόμενες κυτοκινίνες είναι λειτουργικές και αυτή η μεταφορά μπορεί να συμβεί από τη ρίζα προς το βλαστό, καθώς και το αντίστροφο. Σημαντικό εύρημα ήταν πως οι κυτοκινίνες αυτές που προέρχονται από τις ρίζες πιθανόν δεν είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική αύξηση του βλαστού (Matsumoto-Kitano *et al.*, 2008) . Οι τοπικές δράσεις τους λαμβάνουν χώρα σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα κατά την άρση του λήθαργου των ακραίων οφθαλμών ή κατά την προώθηση της εξόδου των κυττάρων από το ακραίο μερίστωμα της ρίζας.

4.3.4.Δράσεις κυτοκινινών.

Οι κυτοκινίνες έχει αποδειχθεί ότι επιδρούν σε πολλές φυσιολογικές και αναπτυξιακές διεργασίες, τόσο σε επίπεδο κυττάρου όσο και σε επίπεδο οργάνου και φυτικού οργανισμού, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται:

- Η επαγωγή της κυτταρικής διαίρεσης σε κύτταρα κάλου παρουσία μίας αυξίνης.
- Η κυτταρική αύξηση.
- Ο σχηματισμός οφθαλμών ή ριζών από καλλιέργειες κάλου όταν βρίσκονται σε κάποια αναλογία με αυξίνη.
- Η αναστολή της αύξησης της ρίζας.
- Η τροποποίηση της ακραίας κυριαρχίας και η προώθηση της αύξησης των πλάγιων οφθαλμών.

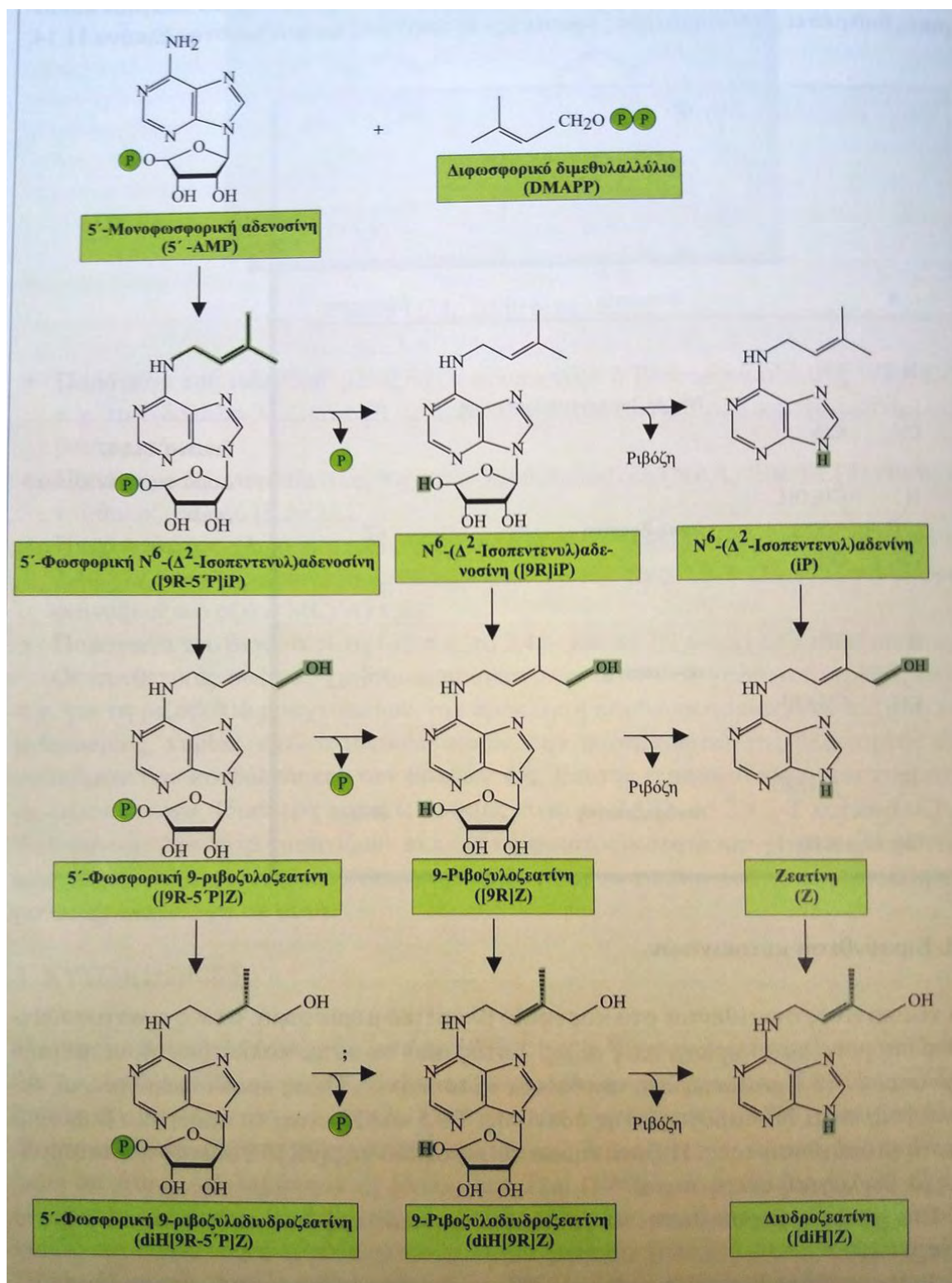
- Η καθυστέρηση της γήρανσης των φύλλων.
- Η ρύθμιση της ανάπτυξης των αγγείων.
- Η άρση του λήθαργου.
- Η διέγερση του ανοίγματος των στοματίων και κατά συνέπεια της διαπνοής των φυτών.

(Cheng *et al.*, 2013).

Παρόλο που, όπως φαίνεται παραπάνω, οι κυτοκινίνες ρυθμίζουν πολλές κυτταρικές διεργασίες, ο έλεγχος της κυτταρικής διαίρεσης είναι θεμελιώδης στη φυτική αύξηση και ανάπτυξη και αποτελεί την βασική λειτουργία της συγκεκριμένης ομάδας φυτοαυξητικών ρυθμιστών.

Οι μηχανισμοί δράσης των κυτοκινινών είναι σχεδόν άγνωστοι. Η πολλαπλή βιολογική τους δράση και η αλληλεπίδραση άλλων ενδογενών και εξωγενών παραγόντων στην επαγωγή και την έκφραση των αποτελεσμάτων δυσχεραίνουν την ανάλυση της μοριακής δράσης των κυτοκινινών.

Όπως και στην περίπτωση των αυξινών η ρύθμιση των ενδογενών συγκεντρώσεων της ορμόνης είναι πολύ σημαντική. Η βιοσύνθεση, ο καταβολισμός, αλλά και η σύζευξη με άλλα βιομόρια είναι οι 3 βασικοί παράγοντες της ρύθμισης αυτής. Ο καταβολισμός επιτυγχάνεται με την οξειδωτική διάσπαση της πλευρικής αλυσίδας από τη ζεατίνη με τη βοήθεια του ενζύμου οξειδάση των κυτοκινινών.



Εικόνα 3, Βιοσύνθεση κυτοκινινών.

4.4.Οι αυξίνες και οι κυτοκινίνες στην ιστοκαλλιέργεια.

Λίγο μετά την ανακάλυψη της κινετίνης, παρατηρήθηκε ότι ο λόγος αυξίνης-κυτοκινίνης ρυθμίζει την μορφογένεση στις ιστοκαλλιέργειες. Η διαφοροποίηση προς ρίζα ή βλαστό μιας ιστοκαλλιέργειας κάλου εξαρτάται από τον λόγο αυξίνης-κυτοκινίνης στο μέσο καλλιέργειας. Οι υψηλές τιμές του λόγου αυξίνη:κυτοκινίνη προκαλούν τον σχηματισμό ριζών, ενώ αντίθετα οι χαμηλές τιμές του λόγου οδηγούν στο σχηματισμό βλαστών. Στην περίπτωση που ο λόγος κυμαίνεται σε ενδιάμεσα επίπεδα, ο ιστός αυξάνεται ως αδιαφοροποίητος κάλος (Skoog & Miller, 1965).

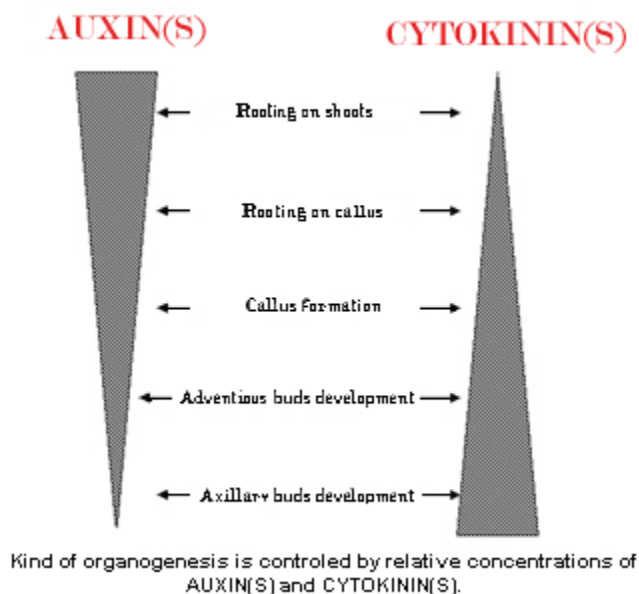
Στην ιστοκαλλιέργεια, οι αλλαγές στις συγκεντρώσεις των ορμονών μέσα στο υπόστρωμα μπορούν να αλλάξουν τελείως την μορφή της ανάπτυξης (Εικόνα 4). Για παράδειγμα με μια μικρή μείωση της συγκέντρωσης της αυξίνης μπορεί η διέγερση του σχηματισμού της ρίζας να ανασταλεί και να ξεκινήσει η ανάπτυξη του κάλου. Για το λόγο αυτό, κάθε σύστημα ιστοκαλλιέργειας είναι μοναδικό και οι επιδράσεις των διάφορων συγκεντρώσεων των ορμονών θα πρέπει να ελέγχονται για την κάθε περίπτωση.

Κατά κανόνα, οι αυξίνες είναι απαραίτητες για να προωθήσουν την αρχική αύξηση του μεριστώματος και την εκβλάστηση των εκφύτων. Είναι πολύ σημαντικό να επιλεγθεί τέτοια συγκέντρωση που να προάγει την αύξηση του βλαστού ή του επιθυμητού οργάνου, χωρίς όμως να βοηθάει τον σχηματισμό κάλου. Για την αναγέννηση βλαστικών εκφύτων, μικρή συγκέντρωση αυξίνης είναι ευεργετική σε συνδυασμό με υψηλές συγκεντρώσεις κυτοκινινών, κυρίως στο στάδιο πολλαπλασιασμού των βλαστών. Παρόλα αυτά, σε αρκετές περιπτώσεις έχει αποδειχθεί ότι η ύπαρξη μόνο κυτοκινινών είναι επαρκής, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις αυξινών είναι τοξικές για τα έκφυτα. Πρόβλημα μπορεί να δημιουργηθεί και από τις πολύ υψηλές συγκεντρώσεις κυτοκινινών, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν τον σχηματισμό πολλών, αλλά μικρών βλαστών που συνήθως αποτυγχάνουν να αναπτυχθούν.

Μετά από πειράματα, έχει βρεθεί ότι κάποιοι ιστοί, όργανα ή μεμονωμένα κύτταρα είναι ικανά να αναπτυχθούν χωρίς την επιπλέον προσθήκη ορμονών στο υπόστρωμα. Αυτά ονομάζονται αυτόνομα, όμως οι περιπτώσεις τους είναι πολύ λίγες και σπανίως δεν γίνεται προσθήκη ορμονών.

Οι αυξίνες που προτιμώνται για την αναγέννηση βλαστών είναι κυρίως οι NAA και IBA. Κάποιοι ερευνητές έχουν δοκιμάσει να προσθέσουν στα υποστρώματα μείγμα πολλών αυξινών μαζί (Blackmon *et al.*, 1981b), όμως τα αποτελέσματα ήταν πολύ διαφορετικά για το κάθε φυτό και την κάθε περίπτωση. Έτσι έχει καθιερωθεί η χρήση μίας ή το πολύ δύο αυξινών μαζί. Οι συνηθέστερες κυτοκινίνες που χρησιμοποιούνται είναι οι BA και κινετίνη (Kn) , όμως έχει ανακαλυφθεί ότι η κινετίνη είναι ανίκανη να προωθήσει την ανάπτυξη βλαστών όσον αφορά στην τριανταφυλλιά (Elliott, 1970).

Τα έκφυτα που χρησιμοποιούνται στις ιστοκαλλιέργειες περιέχουν ήδη κάποιες μικρές συγκεντρώσεις φυσικών ορμονών που παράγονται στα φυτά. Τα επίπεδα της φυσικής αυξίνης που μπορεί να υπάρχει στους ιστούς των εκφύτων εξαρτώνται κυρίως από το μητρικό φυτό από το οποίο έχουν ληφθεί τα έκφυτα. Η ηλικία του μητρικού φυτού, οι συνθήκες κάτω από τις οποίες αναπτύχθηκε, καθώς και η εποχή του χρόνου που έγινε η λήψη των εκφύτων είναι κάποιοι σημαντικοί παράγοντες (Cassells, 1979). Παρόλα αυτά, οι ποσότητες αυτές δεν επαρκούν για την ανάπτυξη των εκφύτων και την μορφογένεση τους.



Εικόνα 4, Η σχετική συγκέντρωση αυξινών-κυτοκινινών που χρειάζονται για την αύξηση και την μορφογένεση.

Οι ρυθμιστές ανάπτυξης σχετίζονται άμεσα με τον κυτταρικό κύκλο. Η κυτταρική διαίρεση φαίνεται ότι ρυθμίζεται από την κοινή δράση των αυξινών και των κυτοκινινών, καθένα από τα οποία επηρεάζει διαφορετικό στάδιο του κυτταρικού κύκλου. Οι αυξίνες δρουν κατά την αναπαραγωγή του DNA, ενώ οι κυτοκινίνες παρουσιάζονται να ελέγχουν τις δράσεις που οδηγούν στη μίτωση (Jouanneau, 1971, John *et al.*, 1993, Pasternak *et al.*, 2000). Έτσι, οι αυξίνες θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως “επαγωγείς”, ενώ οι κυτοκινίνες ως “προωθητές” (Wood *et al.*, 1990).

Ορισμένοι ρυθμιστές, κυρίως αυξίνες, προσκολλώνται στα κυτταρικά τοιχώματα με αποτέλεσμα να επιδρούν πάνω στα κύτταρα ακόμα και όταν αυτά έχουν μεταφερθεί σε νέο υπόστρωμα καλλιέργειας. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται επίδραση εκ μεταφοράς (carry-over effect). Η βιοσύνθεση των διαφορετικών ρυθμιστών είναι άμεσα αλληλοεξαρτημένη, καθώς οι κυτοκινίνες προωθούν τη βιοσύνθεση των αυξινών αλλά οι παραγόμενες αυξίνες παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση των κυτοκινινών (μειώνοντας έτσι τελικά και τη δική τους βιοσύνθεση). Με τον ίδιο ακριβώς τρόπο οι αυξίνες προωθούν τη βιοσύνθεση του αιθυλενίου το οποίο στη συνέχεια παρεμποδίζει τη δική τους. Ακόμα, οι αυξίνες μπορούν να προωθήσουν τη βιοσύνθεση του γιββερελλικού οξέος.

Τέλος, πολύ σημαντικό ρόλο για τη δράση των ορμονών στην ιστοκαλλιέργεια παίζουν η θερμοκρασία στην οποία διατηρούνται οι καλλιέργειες μετά τους αρχικούς χειρισμούς, καθώς και οι συνθήκες φωτός. Η διατήρηση σε αρκετά υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να μειώσει την αποδοτικότητα των ορμονών. Συγκεκριμένα αναφέρεται ότι το IAA και σε μικρότερο βαθμό το IBA είναι θερμικά ασταθής ορμόνες και υπάρχει πιθανότητα να αποσυντίθενται ακόμα και κατά τη διάρκεια της αποστείρωσης. Στην περίπτωση της τριανταφυλλιάς έχει αποδειχθεί ότι η κατάλληλη θερμοκρασία για την διατήρηση της καλλιέργειας είναι 26 ± 2 °C. Η ένταση του φωτός παίζει πολύ σημαντικό ρόλο και έχει βρεθεί ότι η ιδανική ένταση, ιδιαίτερα για την ανάπτυξη βλαστών, είναι 1-3 klux (Horn, 1992). Η φωτοπερίοδος που έχει δώσει την καλύτερη ανάπτυξη των βλαστών είναι 16 ώρες. Η μείωση της συγκέντρωσης του IAA φαίνεται να είναι ταχύτερη σε συνθήκες μεγάλης φωτοπεριόδου, ενώ το IBA παρουσιάζεται ως πιο σταθερός ρυθμιστής ανάπτυξης σε σχέση με όλους τους παράγοντες. Τέλος, οι αυξίνες παρουσιάζουν έντονα το φαινόμενο της οξειδωσης, με το NAA και το 2,4-D να αποτελούν τις εξαιρέσεις (Dunlap *et al.*, 1986).

5.ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να μελετηθεί ποιοι συνδυασμοί φυτορυθμιστικών ουσιών, συγκεκριμένα αυξινών και κυτοκινινών, και σε ποιες συγκεντρώσεις θα μπορούσαν να προάγουν την βλαστική αναγέννηση από κάλο τριανταφυλλιάς ποικιλίας First Red.

B.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Αρχικό υλικό- Κάλος.

Ο κάλος που χρησιμοποιήθηκε για την διεκπεραίωση του πειράματος παραχωρήθηκε από την φοιτήτρια Καρατοσίδου Χαρούλα-Μαρία και την παραγωγή κάλου που έκανε για την διπλωματική της εργασία. Όλες οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν λήφθηκαν από την ίδια πηγή. Ο κάλος προερχόταν από τμήματα βλαστού, φύλλου ή μίσχου φυτού τριανταφυλλιάς ποικιλίας First Red.

2. Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος.

Για την επιτυχία της οργανογένεσης σημαντικότερο ρόλο στην σύσταση του υποστρώματος παίζει η ύπαρξη αυξινών και κυτοκινινών, καθώς και οι αναλογίες στις οποίες βρίσκονται. Για τον λόγο αυτό, παρασκευάστηκαν 14 υποστρώματα με διαφορετικά είδη αυξινών-κυτοκινινών και σε διαφορετικές αναλογίες.

Για την παρασκευή των υποστρωμάτων ποσότητας 1 lt ακολουθήθηκε μια συγκεκριμένη συνταγή που περιλάμβανε πάντα το βασικό θρεπτικό υπόστρωμα Murashige and Skoog (1962) ή απλά MS (η ποσότητα που χρειάζεται αναγράφεται πάνω στο σκεύασμα), 8 gr άγαρ και 30 gr ζάχαρη. Στην περίπτωση των υποστρωμάτων 11 και 12 η ζάχαρη που χρησιμοποιήθηκε ήταν 50 gr/l. Προστίθενταν και οι ανάλογες ποσότητες των εκάστοτε ορμονών όπως φαίνονται στον Πίνακα 1. Οι ορμόνες που χρησιμοποιήθηκαν επειδή είναι σκόνες αδιάλυτες στο νερό, διαλύθηκαν αρχικά με την βοήθεια κάποιων ουσιών και στην πορεία προστέθηκαν στο τελικό διάλυμα. Το BA και το NAA διαλύονται με την προσθήκη λίγων σταγόνων NaOH, η Kn με KOH και το IAA με ακετόνη. Το pH διαμορφωνόταν πάντα στην τιμή 5,8 με την χρήση λίγων σταγόνων NaOH ή HCl .

Γενικά, για την παρασκευή των υποστρωμάτων αναμιγνύεται αρχικά το MS με τις ορμόνες σε κωνική φιάλη των 1000 ml σχεδόν γεμάτη με απιονισμένο νερό με την χρήση μαγνήτη σε μαγνητικό αναδευτήρα. Στη συνέχεια μετράται το pH με ηλεκτρονικό πεχάμετρο, ρυθμίζεται η τιμή του στο 5,8 με τη βοήθεια NaOH ή HCl και προστίθεται το

άγαρ και η ζάχαρη. Η φιάλη κλείνει με βαμβάκι και αλουμινόχαρτο και το υπόστρωμα τοποθετείται σε συνεχή ανάδευση με ταυτόχρονη θέρμανση έως ότου φτάσει λίγο πριν το σημείο βρασμού. Έπειτα κατανέμεται σε μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι σφραγίζονται με βαμβάκι και αλουμινόχαρτο και τοποθετούνται στον κλίβανο υγρής αποστείρωσης στους 121 °C και πίεση 1,5 kg/cm για 20 λεπτά.

Μετά το πέρας της αποστείρωσης οι δοκιμαστικοί σωλήνες μένουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος εντός του κλιβάνου για να παραμείνουν στις ασηπτικές συνθήκες και να στερεοποιηθεί το υπόστρωμα. Έξω από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα αναγράφονται οι αναλογίες των ορμονών που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 1: Αναλογίες ορμονών που χρησιμοποιήθηκαν για τα υποστρώματα και δοκιμαστικοί σωλήνες που παρασκευάστηκαν για το κάθε υπόστρωμα

Υποστρώματα	BA (mg/l)	Kn(mg/l)	NAA (mg/l)	IAA (mg/l)	Αναλογίες ορμονών	Δοκιμαστικοί σωλήνες
Υπόστρωμα 1	2	1				20
Υπόστρωμα 2	3		0,5		6:1	20
Υπόστρωμα 3	5					20
Υπόστρωμα 4	3			0,3	10:1	20
Υπόστρωμα 5	7					40
Υπόστρωμα 6	2,3			0,2	11,5:1	40
Υπόστρωμα 7	5		0,5		10:1	24
Υπόστρωμα 8	7		0,5		14:1	24
Υπόστρωμα 9	10		1		10:1	40
Υπόστρωμα 10	14		1		14:1	40
Υπόστρωμα 11	3	0,5			6:1	50
Υπόστρωμα 12	3	1			3:1	50
Υπόστρωμα 13	3		0,5		6:1	49
Υπόστρωμα 14	3					41

3. Προσθήκη μυκητοκτόνου.

Στην περίπτωση των Υποστρώματων 13 και 14 έγινε προσθήκη μυκητοκτόνου σε κάποιους από τους δοκιμαστικούς σωλήνες. Το μυκητοκτόνο που χρησιμοποιήθηκε είναι το Bumper 13 EC με περιεκτικότητα της δραστικής του ουσίας proiconazole 25% w/v. Πιο συγκεκριμένα, 24 δοκιμαστικοί σωλήνες του Υποστρώματος 13 και 17 σωλήνες του Υποστρώματος 14 παρασκευάστηκαν με την προσθήκη μυκητοκτόνου.

Για να επηρεαστεί όσο το δυνατόν λιγότερο η δράση του μυκητοκτόνου εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών, η προσθήκη του έγινε μετά την αποστείρωση του υποστρώματος. Το υπόστρωμα μπήκε στον κλίβανο χωρίς να μοιραστεί στους δοκιμαστικούς σωλήνες. Μετά το τέλος της αποστείρωσης η κωνική φιάλη αναδευόταν συνεχώς κάτω από κρύο, τρεχούμενο νερό έτσι ώστε να πέσει η θερμοκρασία του υποστρώματος χωρίς όμως να στερεοποιηθεί. Το άνοιγμα της κωνικής φιάλης και η προσθήκη του μυκητοκτόνου έγιναν κάτω από ασηπτικές συνθήκες μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής. Στη συνέχεια προστέθηκε μία σταγόνα από το μυκητοκτόνο και το υπόστρωμα μοιράστηκε στους δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι σφραγίστηκαν με βαμβάκι και αλουμινόχαρτο. Η προσθήκη του μυκητοκτόνου έγινε στη μικρότερη δυνατή ποσότητα με βάση την ποσότητα του συνολικού υποστρώματος. Περισσότερο μυκητοκτόνο θα αύξανε τις πιθανότητες εμφάνισης τοξικότητας στα έκφυτα.

4. Τοποθέτηση κάλου στα υποστρώματα.

Ο κάλος λήφθηκε εντός του θαλάμου νηματικής ροής για να αποφευχθούν τυχόν μολύνσεις. Κόπηκε σε μικρά τεμάχια, με τη χρήση απολυμασμένου νυστεριού και λαβίδας, τα οποία τοποθετήθηκαν σε τριβλίο με λίγες σταγόνες διαλύματος ορμονών, αντίστοιχων αυτών που περιείχε το κάθε υπόστρωμα. Αυτό γινόταν για να εμπλουτιστεί ο κάλος με τις ορμόνες, αλλά κυρίως για να διατηρήσει την υγρασία του έως ότου τοποθετηθεί στους δοκιμαστικούς σωλήνες. Έπειτα ένα τεμάχιο κάλου τοποθετήθηκε σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και σφραγίστηκε ξανά με το βαμβάκι και το αλουμινόχαρτο.

Ο αριθμός των δοκιμαστικών σωλήνων που παρασκευάστηκαν, το είδος του κάλου που χρησιμοποιήθηκε (φύλλου, βλαστού, μίσχου), καθώς και η εποχή λήψης των εκφύτων που έδωσαν τον κάλο φαίνονται στον Πίνακα 2. Ο κάλος που προερχόταν από βλαστό χρησιμοποιήθηκε περισσότερο, καθώς ο βλαστός έδινε καλύτερα αποτελέσματα ανάπτυξης κάλου και μεγαλύτερες ποσότητες. Τέλος, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε ψυγείο στους 26 ± 2 °C και φωτοπερίοδο 16 ωρών και παρατηρήθηκαν σε τακτά χρονικά διαστήματα.

Πίνακας 2: Αριθμός δοκιμαστικών σωλήνων του κάθε υποστρώματος με βάση το είδος του κάλου που περιέχουν.

Υποστρώματα	Κάλος φύλλου	Κάλος βλαστού	Κάλος μίσχου	Εποχή λήψης εκφύτου
Υπόστρωμα 1	10	10		Φεβρουάριος 2016
Υπόστρωμα 2	10	10		Φεβρουάριος 2016
Υπόστρωμα 3	5	10	5	Απρίλιος 2016
Υπόστρωμα 4	5	10	5	Απρίλιος 2016
Υπόστρωμα 5		40		Οκτώβριος 2016
Υπόστρωμα 6		40		Οκτώβριος 2016
Υπόστρωμα 7		24		Νοέμβριος 2016
Υπόστρωμα 8		24		Νοέμβριος 2016
Υπόστρωμα 9		40		Νοέμβριος 2016
Υπόστρωμα 10		40		Νοέμβριος 2016
Υπόστρωμα 11		50		Απρίλιος 2017
Υπόστρωμα 12		50		Απρίλιος 2017
Υπόστρωμα 13		49		Απρίλιος 2017
Υπόστρωμα 14		41		Απρίλιος 2017

5. Τομές σε φυτό στο περιβάλλον.

Με σκοπό να παρατηρηθεί ποια ουσία θα μπορούσε να κρατήσει ανοιχτή μία πληγή στο φυτό έτσι ώστε να βοηθηθεί μια πιθανή οργανογένεση εντός του φυτού σε συνθήκες περιβάλλοντος, έγιναν κάποιες δοκιμαστικές τομές σε γλαστρικό φυτό τριανταφυλλιάς ποικιλίας *Rosa indica* το οποίο τοποθετήθηκε σε εξωτερικό χώρο. Οι τομές έγιναν με αποστειρωμένο νυστέρι σε μεσογονάτιες περιοχές μεταξύ φύλλων, αφού πρώτα είχαν αφαιρεθεί τα ακραία φύλλα και τα άνθη. Έπειτα, οι τομές αλείφθηκαν με βαζελίνη, έλαιο παραφίνης, γαλάκτωμα σιλικόνης, νερό ή τίποτα και καλύφθηκαν κάποιες από αυτές με βαμβάκι για να βρίσκονται υπό σκοτάδι. Η γλάστρα αφέθηκε στο περιβάλλον, ποτιζόταν συχνά και η πορεία των τομών παρακολουθήθηκε.

Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1.Δοκιμές στο εργαστήριο.

Τα 14 υποστρώματα έδωσαν διαφορετικά αποτελέσματα, τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω. Εξαιτίας του μεγάλου ποσοστού μολύνσεων, τα αποτελέσματα που λήφθηκαν δείχνουν την τάση του κάλου για οργανογένεση, χωρίς όμως να εμφανίζεται η ζητούμενη έκπτυξη βλαστού.

Υποστρώματα 1, 5, 6, 11, 12, 13 και 14

Στα υποστρώματα αυτά, ο κάλος δεν παρουσίασε κάποια μεταβολή. Δεν αυξήθηκε σε μέγεθος, δεν παρουσίασε παραγωγή χλωροφύλλης (πρασίνισμα του κάλου) και δεν έδειξε κάποια τάση για οργανογένεση. Μετά από διάστημα 2 μηνών άρχισε να παίρνει ένα σκούρο καφέ- μαύρο χρώμα και τελικά οδηγήθηκε στη νέκρωση. Αρκετές ήταν και οι μολύνσεις που εμφανίστηκαν στα δείγματα με ποσοστά που έφτασαν μέχρι και το 67,5% .Στα Υποστρώματα 13 και 14 που περιείχαν μυκητοκτόνο το ποσοστό των μολύνσεων μειώθηκε αρκετά και κυμάνθηκε από 0%-40%. Μία από τις βασικότερες μολύνσεις που παρατηρήθηκε φαίνεται στην Εικόνα 1, η οποία δεν ταυτοποιήθηκε.



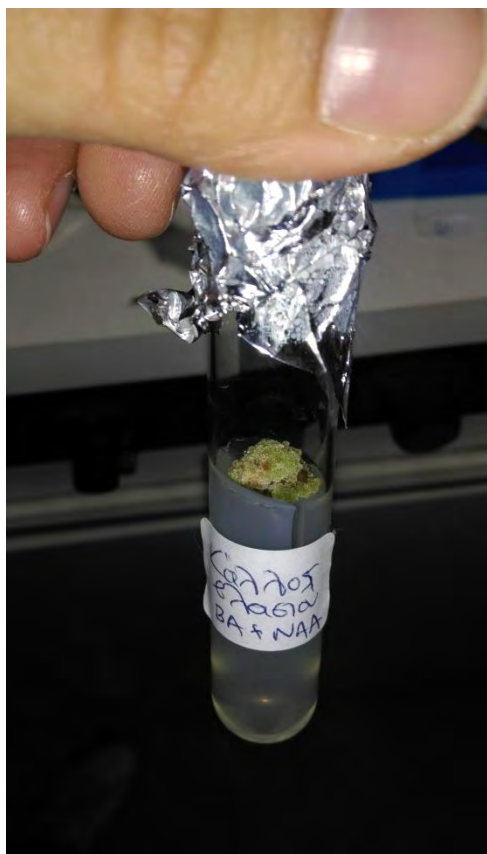
Εικόνα 1, Μόλυνση στα υποστρώματα.

Υπόστρωμα 2

Στο υπόστρωμα αυτό από την 3η εβδομάδα και μετά παρατηρήθηκε μια σταθερή και εμφανής με γυμνό μάτι αύξηση του κάλου (Εικόνα 2). Μετά από 2 μήνες καταγραφών, σε 3 δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν κάλο βλαστού παρατηρήθηκε πρασίνισμα του κάλου το οποίο με τις μέρες γινόταν όλο και πιο έντονο, γεγονός που οφείλεται στην παραγωγή χλωροφύλλης (Εικόνα 3). Παρόλα αυτά δεν υπήρχαν ενδείξεις έκπτυξης βλαστού και περίπου 3 εβδομάδες μετά το πρασίνισμα του κάλου, αυτός άρχισε να καφετιάζει (Εικόνα 4).



Εικόνα 2, Αύξηση μεγέθους του κάλου.



Εικόνα 3, Πρασίνισμα του κάλου.



Εικόνα 4, Καφέτιασμα του κάλου.

Υποστρώματα 3, 4, 9 και 10.

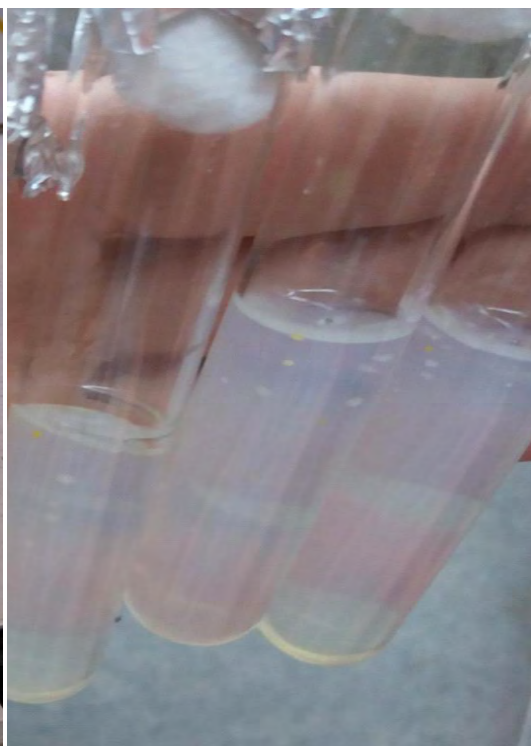
Τα υποστρώματα αυτά εμφάνισαν μολύνσεις στο σύνολό τους σχεδόν από την αρχή της εγκατάστασής τους. Μέσα σε ένα μήνα είχαν καταστραφεί όλα τα δείγματα. Το γεγονός αυτό δεν επέτρεψε την λήψη αποτελεσμάτων ως προς την ζητούμενη οργανογένεση. Κάποιες από τις μολύνσεις που εμφανίστηκαν, αλλά δεν ταυτοποιήθηκαν, φαίνονται στις Εικόνες 5, 6 και 7.



Εικόνα 5, Διάφορες μολύνσεις στα υποστρώματα.



Εικόνα 6, Μόλυνση σε υπόστρωμα.



Εικόνα 7, Μόλυνση σε υπόστρωμα.

Υποστρώματα 7 και 8

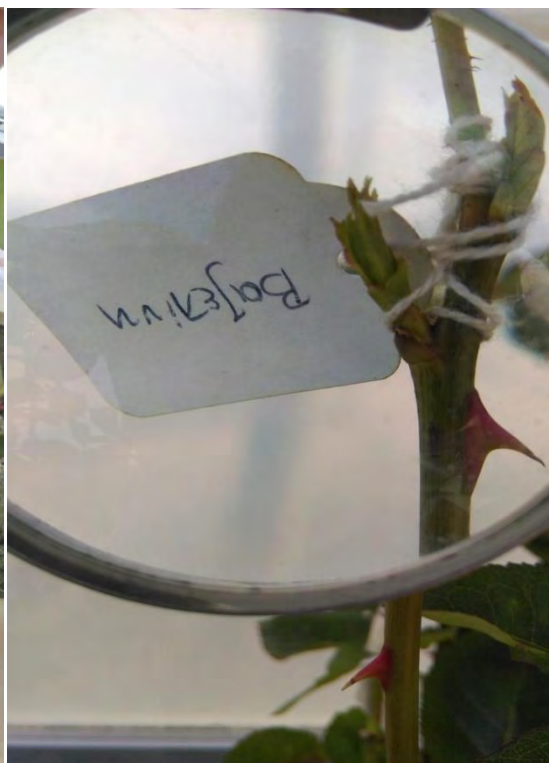
Στα δύο αυτά υποστρώματα, ο κάλος νεκρώθηκε σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Δύο εβδομάδες μετά την εγκατάσταση στα υποστρώματα, το σύνολο του κάλου είχε νεκρωθεί.

2.Δοκιμές στο εξωτερικό περιβάλλον.

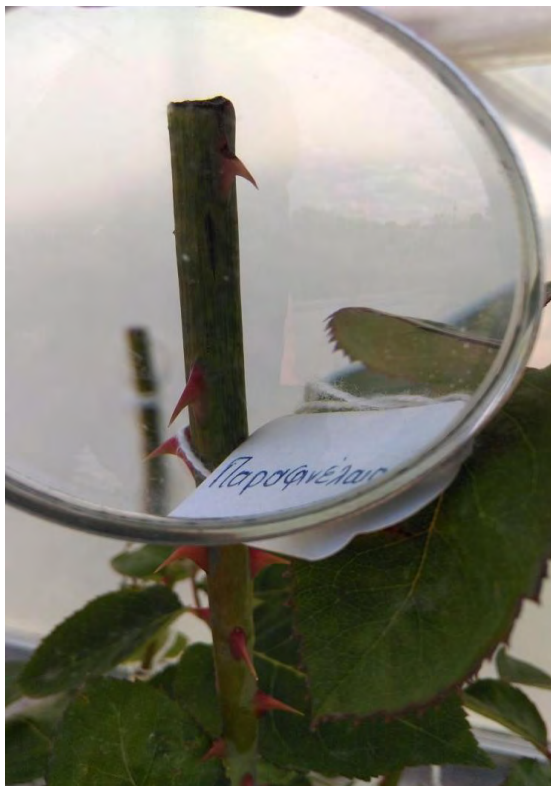
Αρχικά, σκοπός ήταν να μελετηθεί ποιο υλικό θα μπορούσε να παρεμποδίσει την επούλωση μιας πληγής και να την διατηρήσει σε καλή κατάσταση. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν ότι οι πληγές με το γαλάκτωμα σιλικόνης μαύρισαν περιμετρικά σε πολύ σύντομο διάστημα (Εικόνα 8). Πολύ καλά αποτελέσματα έδωσαν η βαζελίνη (Εικόνα 9) και το παραφινέλαιο (Εικόνα 10) που κράτησαν την πληγή ανοιχτή, αλλά ταυτοχρόνως σε πολύ καλή κατάσταση. Οι πληγές με το νερό παρέμειναν ανοιχτές, αλλά περνώντας ο καιρός άρχισαν να μαυρίζουν (Εικόνα 11). Τέλος, οι πληγές χωρίς καμία μεταχείριση παρέμειναν σε αρκετά καλή κατάσταση. Από το σύνολο των πληγών που δημιουργήθηκαν στο φυτό, λήφθηκε το συμπέρασμα ότι τα καλύτερα υλικά για τον σκοπό αυτό είναι η βαζελίνη και το παραφινέλαιο.



Εικόνα 8, Πληγή με γαλάκτωμα σιλικόνης.



Εικόνα 9, Πληγή με βαζελίνη.



Εικόνα 10, Πληγή με παραφινέλαιο.



Εικόνα 11, Πληγή με νερό.

Δ.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναλύθηκε στα αποτελέσματα, η πορεία της βλαστικής αναγέννησης δεν ήταν τόσο ενθαρρυντική. Σχεδόν όλες οι δοκιμές που επιχειρήθηκαν, με τους διαφορετικούς συνδυασμούς φυτορυθμιστικών ουσιών, μολύνθηκαν. Αυτό δεν επέτρεψε στα δείγματα να εξελιχθούν περαιτέρω και να δώσουν ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς την οργανογένεση. Παρ' όλα αυτά, τα δείγματα που δεν μολύνθηκαν, μπορούν να τα κατηγοριοποιηθούν σε τέσσερις ομάδες με βάση την εξέλιξη τους:

- Ο κάλος δεν παρουσίασε καμία μεταβολή. Αυτό συνέβη στα Υποστρώματα 1, 5, 6, 11, 12, 13 και 14. Και στα επτά αυτά υποστρώματα ο κάλος παρέμεινε ακριβώς όπως εγκαταστάθηκε, χωρίς να παρουσιάσει καμία μεταβολή με το πέρασμα του χρόνου. Αυτό οφείλεται στην αναλογία των συγκεντρώσεων αυξίνης-κυτοκινίνης, η οποία δεν ήταν ικανή να οδηγήσει τον κάλο σε βλαστογένεση, αλλά ούτε και σε ριζογένεση, με αποτέλεσμα να παραμένει ως έχει.
- Ο κάλος παρουσίασε μια εμφανή αύξηση μεγέθους. Στο Υπόστρωμα 2, ο κάλος αυξήθηκε σημαντικά σε μέγεθος, αποτέλεσμα που αποδίδεται στην ύπαρξη ισορροπίας μεταξύ αυξίνης και κυτοκινίνης. Όπως είναι γνωστό, η ισορροπία αυτών των δύο οδηγεί στον σχηματισμό και τον πολλαπλασιασμό του κάλου.
- Ο κάλος πρασίνισε. Στο Υπόστρωμα 2, μετά την αύξηση του κάλου, ξεκίνησε η παραγωγή χλωροφύλλης, όπως φαίνεται και από το χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα που πήρε ο κάλος. Ξεκίνησε, δηλαδή, η διαδικασία οργανογένεσης, χωρίς όμως να δημιουργηθεί το επιθυμητό όργανο, καθώς μετά από λίγο ο κάλος άρχισε να νεκρώνεται. Ο συνδυασμός των συγκεντρώσεων αυξίνης και κυτοκινίνης ήταν πιθανόν σωστή για να πυροδοτήσει την οργανογένεση, όμως η συγκέντρωση της κυτοκινίνης δεν ήταν αρκετή για αν εκπτυχθεί ο βλαστός. Επίσης, το γεγονός ότι με το πέρασμα του χρόνου ο κάλος νεκρώθηκε, πιθανόν οφείλεται στην υποβάθμιση των συστατικών του υποστρώματος. Μια επανακαλλιέργεια του πρασινισμένου κάλου σε καινούριο υπόστρωμα, με

λίγο μεγαλύτερη συγκέντρωση κυτοκινίνης, ίσως έδινε το επιθυμητό αποτέλεσμα.

- Ο κάλος νεκρώθηκε. Στα Υποστρώματα 7 και 8 ο κάλος νεκρώθηκε σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Μετά την εγκατάστασή του άρχισε να καφετιάζει, μέχρι που έφτασε σε πλήρη νέκρωση. Η αναλογία των φυτορρυθμιστικών ουσιών είναι αυτή που είναι υπεύθυνη και για αυτό το αποτέλεσμα, η οποία σε αυτές τις περιπτώσεις δεν ήταν ικανή για να διατηρήσει τον κάλο.

Τα Υποστρώματα 3, 4, 9 και 10 δεν μπορούν να κατηγοριοποιηθούν, καθώς μολύνθηκαν εξ' αρχής και καθολικά, με αποτέλεσμα να μη μπορεί να βγει κάποιο συμπέρασμα για την εξέλιξη του κάλου.

Καθοριστικό ρόλο στην συμπεριφορά της τριανταφυλλιάς στην ιστοκαλλιέργεια, έχει ο γενότυπος του φυτού (Khosh-Khui & Sink, 1982, Horn *et al.*, 1988, Short & Roberts, 1991, Horn, 1992, Arnold *et al.*, 1995). Υπάρχουν γένη, ποικιλίες και υβρίδια που είναι υπεύθυνα για την αύξηση του αριθμού των οφθαλμών που δημιουργούνται και για την επιτυχία του πολλαπλασιασμού των βλαστών (Tantikanjana *et al.*, 2001). Οι Khosh-Khui και Sink (1982) παρατήρησαν ότι η ποικιλία Bridal Pink δίνει τον μεγαλύτερο αριθμό βλαστών. Γενικά όμως, τα υβρίδια της τριανταφυλλιάς (*Rosa hybrida*), στα οποία ανήκει και η ποικιλία First Red από την οποία λήφθηκαν τα έκφυτα που έδωσαν τον κάλο για την διεξαγωγή του πειράματος, δίνουν πολύ καλά αποτελέσματα στην ιστοκαλλιέργεια και ειδικά στην βλαστική αναγέννηση. Επομένως, η χρήση της συγκεκριμένης ποικιλίας θα ήταν αναμενόμενο να δώσει καλύτερα αποτελέσματα. Η αδυναμία βλαστικής αναγέννησης από την ποικιλία αυτή, μπορεί να οφείλεται στα υποστρώματα που παρασκευάστηκαν, καθώς η κάθε ποικιλία αντιδρά διαφορετικά στον κάθε συνδυασμό φυτορρυθμιστικών ουσιών (Pati *et al.*, 2006, Carelli *et al.*, 2002).

Μετά την επιλογή του μητρικού φυτού, τους σωστούς χειρισμούς και τη σωστή απολύμανση, αυτό που θα καθορίσει την πορεία της ιστοκαλλιέργειας και την επιτυχημένη αναγέννηση των βλαστών είναι το υπόστρωμα και σύνθεσή του. Αν και το 1967 ο Hill ανέφερε το σχηματισμό βλαστού επάνω σε κάλο που προερχόταν από έκφυτα του Hybrid Tea rose και από τότε αρκετοί ερευνητές έχουν αναγεννήσει

βλαστοφόρους οφθαλμούς, τα περισσότερα πειράματα που έχουν διεξαχθεί αφορούν την άμεση αναγέννηση βλαστών, δηλαδή την δημιουργία βλαστών χωρίς την ενδιάμεση δημιουργία κάλου. Για το λόγο αυτό, το πείραμά μας στηρίχτηκε στα αποτελέσματα πειραμάτων για την άμεση αναγέννηση, παρ' όλο που δικός μας στόχος ήταν η έμμεση αναγέννηση βλαστών από καλικά κύτταρα. Επομένως, αυτός θα μπορούσε να είναι ένας από τους παράγοντες αποτυχίας για την αναγέννηση των βλαστών.

Ξεκινώντας με το υπόστρωμα, η πρώτη επιλογή είναι το βασικό θρεπτικό μέσο. Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο μέσο για τον πολλαπλασιασμό της τριανταφυλλιάς και αυτό που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα είναι το MS (Murashige & Skoog), το οποίο έχει δειχθεί ότι δίνει και τα καλύτερα αποτελέσματα (Davis, 1980). Κάποια άλλα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται στην τριανταφυλλιά είναι το LS (Linsmair & Skoog) και το QL (Quorine Lepoivre) που χρησιμοποιούνται ευρύτατα για τον πολλαπλασιασμό των ποικιλιών του Rosa hybrid (Pittet & Moncousin, 1982, Norton & Boe, 1982).

Το βασικότερο συστατικό του υποστρώματος, που είναι και αυτό που θα καθορίσει την αναγέννηση των βλαστών, είναι οι ρυθμιστές ανάπτυξης. Οι φυτορρυθμιστικές ουσίες, όπως αναφέρθηκε, διεγείρουν κάποιες λειτουργίες του φυτικού κυττάρου και αναστέλλουν κάποιες άλλες, με αποτέλεσμα να κατευθύνουν την καλλιέργεια. Οι αυξίνες και οι κυτοκινίνες, οι ορμόνες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα αυτό, θεωρούνται οι πιο σημαντικές και η αναλογία τους μέσα στο θρεπτικό υπόστρωμα είναι αυτή που θα ορίσει την διαφοροποίηση των κυττάρων είτε προς τη βλαστογένεση είτε προς τη ριζογένεση. Για τη δημιουργία βλαστών απαιτείται υψηλή συγκέντρωση κυτοκινινών, όχι όμως υπερβολική γιατί μπορεί να αποβεί τοξική.

Η κυτοκινίνη που θεωρείται ο πιο διεγερτικός ρυθμιστής ανάπτυξης για τον πολλαπλασιασμό του βλαστού είναι το BA (Vijaya *et al.*, 1991). Έχει δειχθεί ότι 1-10 mg/LBA προκαλούν το «άνοιγμα» των οφθαλμών και τον πολλαπλασιασμό των βλαστών στη Rosa Hybrida (Hasegawa 1980, Wulster & Sacalis 1980). Γι' αυτό αρκετές ήταν οι φορές που σε αντίστοιχα πειράματα το BA ήταν ο μοναδικός ρυθμιστής ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε. Πολλά ήταν και τα πειράματα που δοκίμασαν τη συνδυασμένη δράση κυτοκινινών και κυρίως του BA και της κινετίνης. Ενώ η κινετίνη ως μοναδική κυτοκινίνη σε ένα υπόστρωμα δεν έδωσε καλά αποτελέσματα (Skirvin &

Chu, 1979, Bressan *et al.*, 1982, Short & Roberts, 1991, Horn 1992), ο συνδυασμός της με το BA έδωσε κάποια αρκετά ικανοποιητικά. Παρά το γεγονός ότι σε πολλές περιπτώσεις η ύπαρξη μόνο κυτοκινινών είναι αρκετή για την έκπτυξη και τον πολλαπλασιασμό βλαστών, η προσθήκη μικρής ποσότητας αυξίνης είναι ευεργετική για την αναγέννηση τους. Όπως αναφέρθηκε, η ποσότητα αυτή των αυξινών δεν πρέπει να είναι μεγάλη γιατί προκαλεί τοξικότητα στα έκφυτα.

Ο συνδυασμός 3 mg/L BA με 0,5 mg/L NAA σε αναλογία 6:1, του Υποστρώματος 2, ήταν ο μοναδικός συνδυασμός που έδωσε κάποια σημάδια εξέλιξης. Στην περίπτωση αυτή υπήρχε εμφανής αύξηση του κάλου μετά από 3 εβδομάδες, γεγονός που αποδίδεται στην ύπαρξη ισορροπίας μεταξύ του BA και του NAA και μετά από 2 μήνες συνεχών παρακολουθήσεων ο κάλος άρχισε να πρασινίζει σταδιακά, δηλαδή να παράγει χλωροφύλλη. Η παραγωγή χλωροφύλλης ήταν ένα θετικό βήμα προς την οργανογένεση, η οποία όμως δεν ακολούθησε, καθώς μετά από λίγες εβδομάδες το πρασίνισμα σταμάτησε χωρίς να φαίνεται κάποια δημιουργία βλαστού και οι κάλοι άρχισαν να νεκρώνονται. Αυτό πιθανόν οφείλεται στην υποβάθμιση του υποστρώματος εξαιτίας του πολυκαιρισμού και κατ' επέκταση στην έλλειψη των απαραίτητων στοιχείων για την περαιτέρω εξέλιξη του πρασινισμένου κάλου. Ο συνδυασμός αυτός επαναλήφθηκε έναν χρόνο μετά, χωρίς όμως να δώσει τα ίδια θετικά αποτελέσματα. Οι κάλοι που δεν εμφάνισαν μολύνσεις, δεν παρουσίασαν καμία απολύτως μεταβολή. Δεδομένου του ίδιου υποστρώματος και των ίδιων μεταχειρίσεων του κάλου, το πιο πιθανό σενάριο αποτυχίας είναι το μητρικό φυτό από το οποίο προήλθαν τα έκφυτα που παρήγαγαν τον κάλο.

Στην περίπτωση των Υποστρωμάτων 1, 5, 6, 11, 12, 13 και 14 που ο κάλος δεν παρουσίασε καμία μεταβολή, υπεύθυνη είναι η αναλογία των συγκεντρώσεων των φυτορρυθμιστικών ουσιών. Τα αποτελέσματά μας, έρχονται σε αντίθεση με αποτελέσματα άλλων πειραμάτων, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην χρήση διαφορετικής ποικιλίας τριανταφυλλιάς, καθώς ο γενότυπος κατέχει καθοριστικό ρόλο. Η αντίδραση διαφορετικών ποικιλιών στο ίδιο υπόστρωμα και στις ίδιες μεταχειρίσεις μπορεί να ποικίλει σημαντικά (Carelli *et al.*, 2002). Για παράδειγμα στο Υπόστρωμα 1 που συνδύαζε 2 mg/L BA και 1 mg/L Kn, ο κάλος δεν παρουσίασε καμία μεταβολή, ενώ στο ίδιο υπόστρωμα, έκφυτα της ποικιλίας Al-Taif έδωσαν επιτυχημένη έκπτυξη βλαστών

σε ποσοστό 85% (Attia A., El Dessoky S., El-Tarras A., 2012). Παρομοίως, στα Υποστρώματα 11 και 12 οι συνδυασμοί 3mg/L BA και 0,5 mg/L K_n και 3 mg/L BA και 1 mg/L K_n δεν έδωσαν την επιθυμητή οργανογένεση, όμως οι ίδιοι συνδυασμοί με τη χρήση εκφύτων της ποικιλίας Heirloom έδωσαν 3,2 βλαστούς ανά έκφυτο και 3,6 βλαστούς ανά έκφυτο αντίστοιχα (Kanchanapoom Kan., Sakpeth P., Kanchanapoom Kam., 2009).

Στα Υποστρώματα 7 και 8, η αδυναμία διατήρησης του κάλου δείχνει έναν αρκετά λανθασμένο συνδυασμό των φυτορρυθμιστικών ουσιών, καθώς ο κάλος όχι απλά δεν οδηγήθηκε σε οργανογένεση, είτε βλαστογένεση είτε ριζογένεση, αλλά νεκρώθηκε και σε ένα αρκετά μικρό χρονικό διάστημα. Παρ' όλα αυτά το Υπόστρωμα 7 με συνδυασμό 5 mg/L BA και 0,5 mg/L NAA, ήταν πολύ αποδοτικό για τα έκφυτα της ποικιλίας Baronesse με έκπτυξη 2,67 βλαστών ανά έκφυτο (Carelli *et al.*, 2001).

Μετά τις καθολικές μολύνσεις των Υποστρωμάτων 3, 4, 9 και 10, αλλά και τα αρκετά μεγάλα ποσοστά μολύνσεων στα υπόλοιπα υποστρώματα που δυσκόλεψαν την λήψη παρατηρήσεων και αποτελεσμάτων, δοκιμάστηκε η χρήση μυκητοκτόνου εντός των υποστρωμάτων. Η κατάληξη ήταν πολύ θετική, με το Υπόστρωμα 13 να παρουσιάζει 41,7% μολύνσεις με τη χρήση μυκητοκτόνου έναντι 52% χωρίς τη χρήση του και το Υπόστρωμα 14 να μην εμφανίζει καμία μόλυνση με το μυκητοκτόνο, σε αντίθεση με το 37,5% μολύνσεων χωρίς αυτό. Η αρκετά μεγάλη διαφορά στα δύο υποστρώματα μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικού τύπου μόλυνση και στην αναποτελεσματικότητα του συγκεκριμένου μυκητοκτόνου (Bumper 25 EC) να την αντιμετωπίσει. Οι μολύνσεις αυτές μπορεί να οφείλονται σε λανθασμένους χειρισμούς (κατά την απολύμανση του κάλου ή του υποστρώματος) και για αυτές να είναι υπεύθυνη ποικιλία βακτηρίων ή μυκήτων. Τέλος, πολύ σημαντική είναι η εποχή λήψης των εκφύτων από το μητρικό φυτό και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο για την πορεία της ιστοκαλλιέργειας, καθώς σχετίζεται με το στάδιο ανάπτυξης του φυτού. Εξίσου σημαντικές είναι και οι συνθήκες ανάπτυξης, καθώς και η φυσιολογική κατάσταση και υγεία του μητρικού φυτού, γι' αυτό και τα φυτά προήλθαν από ανθοπωλείο και θερμοκηπιακή καλλιέργεια, έτσι ώστε το φυτό να πληροί όσο το δυνατόν περισσότερες προϋποθέσεις.

Ε.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, από τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος και από τη λήψη των αποτελεσμάτων, προέκυψαν τα παρακάτω στοιχεία:

- Το υπόστρωμα που θα μπορούσε να μετεξελιχθεί σε κατάλληλο για αναγέννηση βλαστών ποικιλίας First Red από κάλο είναι αυτό που περιείχε 3 mg/L BA και 0,5 mg/L NAA σε αναλογία 6:1.
- Το συγκεκριμένο υπόστρωμα, αν και δεν έδωσε την επιθυμητή οργανογένεση, ήταν το μοναδικό που οδήγησε σε αύξηση του κάλου και παραγωγή χλωροφύλλης.
- Πιθανόν, η επανακαλλιέργεια του πρασινισμένου κάλου σε καινούριο υπόστρωμα με αυξημένη την συγκέντρωση του BA να έδινε έκπτυξη βλαστού.
- Το φυτό της τριανταφυλλιάς εμφανίζει μεγάλα ποσοστά μολύνσεων, τα οποία μπορούν να αποβούν καταστροφικά για την ιστοκαλλιέργεια, φαινόμενο που μειώνεται σημαντικά με την προσθήκη μυκητοκτόνου στα υποστρώματα.
- Το καλύτερο υλικό για την καθυστέρηση της επούλωσης των πληγών και της διατήρησής τους σε καλή κατάσταση, στην τριανταφυλλιά είναι η βαζελίνη και το παραφινέλαιο.

Η έρευνα που γίνεται πάνω στο θέμα του πολλαπλασιασμού της τριανταφυλλιάς, όπως και το συγκεκριμένο πείραμα, καθώς και οι ανακαλύψεις που προκύπτουν από αυτή, μπορούν να θέσουν νέους στόχους για την εξέλιξη του κλάδου. Η επιτυχία του συγκεκριμένου πειράματος θα μπορούσε να θέσει την αρχή για ένα εξελιγμένο είδος εμβολιασμού. Ο επιτυχημένος συνδυασμός φυτορυθμιστικών ουσιών θα μπορούσε να οδηγήσει στην αναγέννηση βλαστικών εκφύτων τριανταφυλλιάς από καλικά κύτταρα και σε μία μελλοντική επίτευξη εμβολιασμού απευθείας με τα κύτταρα αυτά επάνω στο φυτό. Έτσι, η κουραστική και με μεγάλη πιθανότητα αποτυχίας παραδοσιακή μέθοδος του εμβολιασμού, θα ήταν δυνατό να μετατραπεί σε μία σύγχρονη και πολύ γρήγορη μέθοδο πολλαπλασιασμού.

ΣΤ.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Attia, O.A., El Dessoky, S., El-Tarras, E., 2012, In vitro propagation of Rosa hybrid L. cv. Al- Taif rose plant.
- Blackmon, W.J., Reynolds, B.D & Postek, C.E., 1981b. Production of somatic embryos from callused cantaloupe hypocotyls explants. Hort Science 16, 451.
- Carelli B.P., Echeverrigaray S., 2001, An improved system for the in vitro propagation of rose cultivars.
- Cassells, A.C., 1997. Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation. Kluwer, Dordrecht.
- Cosgrove, D.J., 2001. Wall structure and wall loosening. A book backwards and forward. Plant Physiol.
- Davey, M.R. & Anthony, P., 2010, Plant Cell Culture: Essential Methods. Wiley Publishers, Hoboken, NJ, 358 p., ISBN 978-0470686485, DOI: 10.1002/9780470686522.
- Elliott, R.F., 1970. Axenic culture of meristem tips of Rosa multiflora, Planta 95, 183-186.
- Gambrog, O.L & Phillips G., 2013. Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods. Springer, Berlin, 359 p., ISBN 978-3642489747.
- George, E.F., Hall M.E. & de Klerk G.-J., 2007. Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background. Springer, Berlin, 502 p., ISBN 978-1402050046.
- Horn, W.A.H., 1992. Micropropagation of rose (Rosa L.). In: Bajaj, Y.P.S. (ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 20, Pp: 320– 42. Springer, Berlin.
- Iliev, I., Gajdosova. A., Libiakova, G. & Mohan Jain S., 2010. Plant micropropagation. In: Davey MR, Anthony P, Eds. Plant Cell Culture: Essential Methods. Wiley Publishers, Hoboken, NJ, pp. 1-24, ISBN 978-0470686485, DOI: 10.1002/9780470686522.
- Jan SpekRozen, B.V. – Interplant Roses B.V. The colourful world of Interplant Roses.

- Kanchanapoom, Kan., Sakpeth, P., Kanchanapoom, Kam., 2009. In vitro flowering of shoots regenerated from cultured nodal explants of Rosa hybrid cv. 'Heirloom'.
- Kintzios, S., Triantafyllou, M. & Drossopoulos, J., 1996a. Effect of genotype and different growth regulator treatments on callus induction, proliferation and plant regeneration from mature wheat embryos. *Cereal Research Communications* 24: 147-153.
- Kintzios, S., Hiureas, G., Shortsiannis, E., Sereti, E., Blouhos, P., Manos, C., Makri, O., Taravira, N., Drossopoulos, J. & Holevas, C.D., 1998. The effect of light on the induction, development and maturation of somatic embryos from various horticultural and ornamental species. *Acta Horticultura* 461: 427-432.
- Khayat, E., 2012. An engineering view to micropropagation and generation of true to type and pathogenfree plants. In: Altman, A., ed. *Plant Biotechnology and Agriculture*, Elsevier, pp. 229-241.
- Kozai, T., Afreen, F.F., & Zobayed, S.M.A., 2005. Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System. Springer, Berlin, 316 p. ISBN 978- 1402031250.
- Lazarowitz, S.G and T. Bisseling., 1997. Plant development from the cellular perspective: Integrating the signals. *Plant cell* 9:1884-1890.
- Ljung, K., Bhalarao, R. P., and Sandberg, G., 2001. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. *Plant J.* 28: 465-474.
- Loyola-Vargas, V.M., & Vázquez-Flota, F., 2005. *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press, New York, NY, 394 p., ISBN 978-1588295477.
- Matsumoto-Kitano, M., Kusumoto, T., Tarkowski, P., Kinoshita-Tsujimura, K., Vaclavikova, K., Miyawaki, K., Kakimoto, T., 2008. Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proc . Natl. Acad. Sci USA* 105:20027-20031.
- Mezghani, N., Jemmali, A., Elloumi, N., Gargouri-Bouزيد, R., & Kintzios, S., 2007. Morpho-histological study on shoot bud regeneration in cotyledon cultures of pepper (*Capsicum annuum*). *Biologia* 6:704- 710.
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M., and Kakimoto, T., 2004. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: Tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J.* 37:128-138.

- Mujib, A., Cho, M.J., & Predieri, S., 2004. In Vitro Application in Crop Improvement. CRC Press, Boca Raton, FL, 338 p., ISBN 978-1578083008.
- Neelakandan, A.K., & Wang, K., 2012. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Reports* 31: 597–620.
- Neumann, K.-H., & Kumar, A., 2009. *Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology: Basics and Application (Principles and Practice)*. Springer, Berlin, 333 p., ISBN 978-3540938828.
- Ozel & Arslan, 2016. Efficient Micropropagation of English Shrub Rose “Heritage” Under in Vitro Conditions.
- Pati, P.K., Rath, S.P., Sharma, M., Sood, A. & Ahuja, P.S., 2006. In vitro propagation of rose-a review. *Biotechnol. Advances*, 24: 94–114.
- Pertwee, J., 2004. Production and marketing of Roses II. *Flower Tech*.
- Reuveni, M. & Evenor, D., 2007. On the effect of light on shoot regeneration in petunia. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 89: 49–54.
- Zhang, Y., Zhou, J., Wu, T., & Cao, J., 2008. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 93: 323–331.
- Roubelakis, K. A. & Tran Thanh Van, K., 1993. *Plant Morphogenesis : Molecular Approaches*. Plenum Publ. Co., New York. ISBN 0-306-445972.
- Scoggins, L. & Bridgen, M., 2013. *Plants from Test Tubes: An Introduction to Micropropagation*, 4th Edition. Timber Press, Portland, OR, 274 p., ISBN 978-1604692068.
- Skoog, F. & Miller, C.O., 1965. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. In *Molecular and Cellular Aspects of Development*, E. Bell, ed., Harper and Row, New York, pp. 481-494.
- Slovin, J., Bandurski, R., Cohen, J. Auxin. In: Hooykaas P, Hall M, Libbenga K, editors. *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*. Vol. 33. Amsterdam: Elsevier Science; 1999. pp. 115–140.
- Smith, R., 2013. *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*, 3rd Edition. Academic Press, Waltham, MA, 208 p., ISBN 978-0124159204.

- Srivastava, L.M., 2002. Plant growth and development. Hormones and Environment. Academic Press, London. ISBN 0-12-660570-X.
- Stepanova, A., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L., De-Yu Xie, Dolezal, K., Schlereth, A., Jurgens, G. & Alonso, J., 2008. TAA1-Mediated Auxin Biosynthesis Is Essential for Hormone Crosstalk and Plant Development.
- Taiz, L. & E. Zieger., 2002. Plant Physiology. Sinauer Associates, Sunderland, USA. ISBN 0-87893-823-0.
- Tao, Y., Jean-Luc, F., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Jeff, A., Javier, E., Marianne, E., Bowman, A., Lauren, J. I., Cheng, Y., Lim, J., Zhao, Y., Ballare, C., Sandberg, G., Noel, J. & Chory, J., 2008. Rapid Synthesis of Auxin via a New Tryptophan-Dependent Pathway Is Required for Shade Avoidance in Plants.
- Thomas, P., 2004. In vitro decline in plant cultures: detection of a legion of covert bacteria as the cause for degeneration of long-term micropropagated triploid watermelon cultures. Plant Cell, Tissue & Organ Culture 77: 173–179.
- Vasiln, I.K. & Thorpe, T.A., 1994. Plant Cell and Tissue Culture. Springer, Berlin, 593 p. ISBN 978-94- 017-2681-8.
- Wang, Q.-M., & Wang, L., 2012. An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. Plant Cell Reports 31: 1535–1547.
- Woodward, W. & Bartel, B., 2005. Auxin: Regulation, action, and interaction. Annals Botany 95: 707-735.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alvarez, J.A. Οι εμβολιασμοί των καρποφόρων και των καλλωπιστικών. Εκδόσεις Ψύχαλου, Αθήνα.
- Βασιλακάκης, Μ., 2004. Γενική και Ειδική Δενδροκομία.
- Γαλάτης, Β., Γανωτάκης, Δ., Γκάνη-Σπυροπούλου, Κ., Καραμπουρνιώτης, Γ., Κοτζαμπάσης, Κ., Κωνσταντινίδου, Ε-Ι., Μανέτας, Ι., Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Κ.Α., 2003. Φυσιολογία φυτών από το μόριο στο περιβάλλον.

- Κίντζιος, Σ., 1994. Επιχειρηματική Ιστοκαλλιέργεια. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη, σελ. 139. ISBN 960-351- 009-2.
- Μετζάκης, Δ., 2005. Καλλιέργειες in vitro. Αθήνα: Εκδόσεις Ίων, σελ. 198. ISBN 960-411-526-X.
- Μποζαμπαλίδης, Α., 2011, Βοτανική Μορφολογία και Ανατομία Φυτών, Τόμος Α.
- Παπαδημητρίου, Μ., 2002. Σημειώσεις δρεπτών ανθέων Ι θεωρία. Τ.Ε.Ι Ηρακλείου, Σελ: 30- 48, 102-127.
- Παπαδημητρίου, Μ., 2002. Εργαστήριο δρεπτών ανθέων. Για σπουδαστές ΘΕΚΑ-ΣΤΕΓ. Τ.Ε.Ι Ηρακλείου, Σελ:27-29, 54-55, 70-75.
- Σάββας, Δ., 2003, Γενική ανθοκομία.
- Τσόγκας, Μ., Παπαχατζή-Αποστολάτου, Μ., 1993. Παραγωγή Πολλαπλασιαστικού Υλικού Ανθοκομίας. ΣΤ' Έκδοση, ΟΕΔΒ, Αθήνα.
- Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων., 2007. Προοπτικές ανάπτυξης τομέα ανθοκομίας (με βάση προτάσεις και συμπεράσματα περιφερειακών μελετών νέας ΚΑΠ).